

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Zavedenie metódy pre izoláciu exozómov z ľudskej krvi

Bc. Michaela Gállová

Diplomová práca

2020

UNIVERSITY OF PARDUBICE
FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY

Development of method for exosomes isolation from human blood

Bc. Michaela Gállová

Thesis

2020

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Michaela Gállová**
Osobní číslo: **C18484**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Bioanalytik**
Téma práce: **Zavedení metody pro izolaci exozómů z lidské krve**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Teoretická část:

V teoretické části diplomové práce stručně popište strukturu a funkci exozómů, shrňte dostupné informace o roli exozómů u mnohobuněčných organismů s důrazem na znalosti o funkci exozómů u vyšších savců. Dále popište varianty mezibuněčné komunikace a molekuly účastníci se těchto dějů. Zjistěte a stručně popište, zda exozomy mají vliv na patofyziologii nádorových onemocnění. Zaměřte se na možnosti využití nádorově specifických exozómu v diagnostice nádorových onemocnění. Dále v práci popište současné metody izolace a charakterizace těchto extracelulárních váčků, včetně popisu v současné době na trhu dostupných komerčních testů. Uveďte praktické příklady jejich použití s důrazem na přednosti a negativa těchto principiálně se lišících metodických postupů.

Experimentální část:

V rámci experimentální části se seznamte a prakticky si vyzkoušejte metodu elektroforetické separace proteinů (SDS-PAGE), techniku western-blot s imunodetekcí pro ověření účinnosti izolace exozómů, 1D elektroforézu pro kontrolu eluentů. Naučte se práci s magnetickými částicemi, seznamte se s principy magnetické separace, vyzkoušejte si metody kovalentní vazby IgG na povrch magnetických částic. Elektroforeticky si ověřte účinnosti vazby a výsledky vyhodnoťte. Nosič použijte k izolaci exozómů z biologického materiálu. Vyzkoušejte si min. tři postupy izolace exozómů pomocí komerčně nabízených diagnostických setů. Porovnejte klady a zápory metod a porovnejte výtěžnost zavedené metody a čistotu výsledného produktu s výsledky získanými pomocí komerčních kitů.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí diplomové práce: **prof. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant diplomové práce: **Mgr. Eliška Zelinková**
Katedra biologických a biochemických věd
Datum zadání diplomové práce: **20. prosince 2019**
Termín odevzdání diplomové práce: **7. května 2020**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2020

Prehlasujem:

Túto prácu som vypracovala samostatne. Všetky literárne pramene a informácie, ktoré som v práci využila, sú uvedené v zozname použitej literatúry.

Bola som oboznámená s tým, že sa na moju prácu vzťahujú práva a povinnosti vyplývajúce zo zákona č. 121/2000 Zb., autorský zákon, predovšetkým so skutočnosťou, že Univerzita Pardubice má právo na uzavretie licenčnej zmluvy o použití tejto práce ako školského diela podľa § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tým, že ak dôjde k použitiu tejto práce mnou alebo bude poskytnutá licencia o použití inému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávnená odo mňa požadovať primeraný príspevok na úhradu nákladov, ktoré na vytvorení diela vynaložila, a to podľa okolností až do ich skutočnej výšky.

Beriem na vedomie, že v súlade s § 47b zákona č. 111/1998 Zb., o vysokých školách a o zmene a doplnení ďalších zákonov (zákon o vysokých školách), v znení neskorších predpisov, a smerníc Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práca zverejnená v Univerzitnej knižnici a prostredníctvom Digitálnej knižnice Univerzity Pardubice.

Súhlasím s prezenčným sprístupnením svojej práce v Univerzitnej knižnici.

V Pardubiciach dňa 30. 6. 2020

.....

Bc. Michaela Gállová

Rada by som poďakovala vedúcej mojej diplomovej práce prof. RNDr. Zuzane Bílkovej, Ph.D. a konzultantke Mgr. Eliške Zelinkovej za odborné vedenie, profesionálny no vždy láskavý a pozitívny prístup, cenné rady a pripomienky nielen čo sa týka práci v laboratóriu ale aj pri spracovaní celej diplomovej práce. Ďalej by som chcela poďakovať celej mojej rodine, kamarátom a snúbencovi za pomoc, trpezlivosť a povzbudivé slová.

ANOTÁCIA

Táto diplomová práca je zameraná na zavedenie systému izolácie exozómov, pomocou ktorej by bolo možné detegovať tieto EVs z ľudskej krvi. Tento Systém je založený na kombinácii imunoanalýzy magnetickej separácie na báze imunoprecipitácie a imunochemickej detekcie vyizolovaných exozómov komerčným izolačným kitom. Princíp separácie spočíva v reakcii antigénu v podobe povrchových proteínov na exozómoch so špecifickými monoklonálnymi a polyklonálnymi protilátkami imobilizovanými na komerčných magnetických časticách namierených proti týmto exozomálnym proteínom. Prítomnosť exozómov vo vzorkách séra je detegovaná metódou Semi-Dry Western blot pomocou sekundárnych protilátok značených chrenovou peroxidázou (HRP) pre chemiluminiscenčnú detekciu po predchádzajúcom rozdelení proteínov SDS-PAGE analýzou. Konečným overením prítomnosti exozómov vo vyizolovanej frakcii je hmotnostná analýza po proteolytickom naštepení proteínov z gélu modifikovaným trypsínom.

KEÚČOVÉ SLOVÁ

Exozómy, extracelulárne vezikuly, imunoprecipitácia, magnetické častice, polyklonálne a monoklonálne protilátky, SDS-PAGE, Semi-Dry Western blot analýza, ľudské sérum

ANNOTATION

This diploma thesis is focused on the introduction of a system of isolation of exosomes, which could be used to detect these EVs from human blood. This system is based on a combination of magnetic separation immunoassay based on immunoprecipitation and immunochemical detection of isolated exosomes with a commercial isolation kit. The principle of separation is the reaction of antigen in the form of surface proteins on exosomes with specific monoclonal and polyclonal antibodies immobilized on commercial magnetic particles directed against these exosomal proteins. The presence of exosomes in serum samples is detected by Semi-Dry Western blot using horseradish peroxidase (HRP) labeled secondary antibodies for chemiluminescent detection after pre-separation of the proteins by SDS-PAGE analysis. The final verification of the presence of exosomes in the isolated fraction is the mass analysis after proteolytic digestion of the proteins from the gel with modified trypsin.

KEYWORDS

Exosome, extracellular vesicles, immunoprecipitation, magnetic beads, polyclonal and monoclonal antibody, SDS-PAGE, Semi-Dry Western blot analysis, human serum

Obsah

0	ÚVOD.....	17
1	Medzibunková komunikácia.....	18
1.1	Vezikulárny transport proteínov	18
1.2	Extracelulárne vezikuly.....	19
1.2.1	História objavenia existencie extracelulárnych vezikúl.....	20
1.2.2	Vznik extracelulárnych vezikúl	20
1.2.3	Rozdelenie extracelulárnych vezikúl.....	21
1.2.4	Štruktúra extracelulárnych vezikúl	23
1.2.5	Význam extracelulárnych vezikúl	23
2	Exozómy	25
2.1	Štruktúra exozómov	25
2.1.1	Proteínová zložka.....	26
2.1.2	Lipidová zložka.....	28
2.1.3	Nukleové kyseliny	29
2.2	Biogenéza exozómov	30
2.2.1	Význam cytosolického endozomálneho triediaceho komplexu.....	31
2.2.2	Biogenézia nezávislá na ESCRT mechanizme	32
2.3	Sekrécia exozómov	33
2.3.1	Regulačné mechanizmy sekrécie exozómov	33
2.4	Funkcia exozómov	34
2.4.1	Exozómy a imunitný systém.....	34
2.4.2	Úloha exozómov v karcinogénzii	35
3	Využitie exozómov v diagnostike nádorových ochorení.....	38
3.1	Metódy izolácie a detekcie exozómov	38
3.1.1	Ultracentrifugácia	39
3.1.2	Ultrafiltrácia.....	40
3.1.3	Gélová permeačná chromatografia	41
3.1.4	Precipitačné techniky	43
3.1.5	Imunoafinitné metódy	44
3.2	Metódy charakterizácie exozómov	46
3.2.1	Elektrónové mikroskopické metódy	47
3.2.2	Mikroskopia atomárnych síl	48
3.2.3	Dynamický rozptyl svetla	49
3.2.4	Prietoková cytometria	50

3.2.5	Analýza sledovania nanočastíc	50
3.2.6	Imunoanalýza.....	51
3.2.7	Mikrofluidné systémy	52
4	Experimentálna časť	55
4.1	Prístroje a pomôcky.....	55
4.2	Polyakrylamidová gélová elektroforéza v prostredí dodecylsulfátu sodného (SDS – PAGE).....	55
4.2.1	Farbenie gélov s koloidným roztokom amoniakálneho striebra.....	58
4.2.2	Farbenie gélov s Commasie brilliant blue	59
4.3	Semi – Dry Western blot (WB).....	59
4.3.1	Opätovné naviazanie sekundárnych protilátok („rebinding“) pre overenie nešpecifickej skríženej reakcie	61
4.4	Dot blot analýza	61
4.5	Izolácia exozómov z ľudského séra komerčnými testami	63
4.6	Príprava imunosorbentu	64
4.6.1	2-kroková imobilizácia protilátok na magnetické častice.....	64
4.6.2	Imobilizácia protilátok na nosič s proteínom A/G s následným zosieťovaním (cross-linking) použitím DMP	65
4.7	Overenie účinnosti imunosorbentu vychytaním antigénu – vyzolovanej frakcie exozómov z ľudského séra.....	67
4.8	Deplécia ľudského sérového albumínu	67
4.9	Proteolytické štiepenie z gélu (In Gel Digest) modifikovaným trypsínom.....	68
5	Výsledky a diskusia	70
5.1	Výber vhodného magnetického nosiča pre prípravu imunosorbentu.....	70
5.1.1	Príprava modelového imunosorbentu imobilizáciou špecifických protilátok na magnetické SeraMag a BcMag Proteín G nosiče	73
5.1.2	Overenie funkčnosti modelových imunosorbentov metódami SDS-PAGE a Semi-Dry Western blot	74
5.1.3	Optimalizácia podmienok prípravy imunosorbentu pri BcMag Proteín G nosiči ..	76
5.2	Izolácia exozomálnej frakcie pomocou komerčných testov	78
5.2.1	Porovnanie komerčných testov pre izoláciu exozomálnej frakcie metódou SDS-PAGE	78
5.2.2	Overenie účinnosti izolácie exozomálnej frakcie špecifickými protilátkami namierenými proti povrchovým znakom na exozómoch.....	79
5.2.3	Overenie funkčnosti špecifických monoklonálnych protilátok anti-CD63 a anti-81 s CAI ako kontrolou správnosti prevedenia testu	80
5.3	Optimalizácia izolácie exozomálnej frakcie komerčným testom.....	82

5.3.1	Overenie optimalizácie izolácie exozómov s prídavkom 2 M močoviny z čerstvého a mrazeného séra metódou SDS-PAGE a Western blot	82
5.3.2	Overenie funkčnosti špecifických polyklonálnych anti-CD63 protilátok s následnou optimalizáciou použitého riedenia	87
5.3.3	Overenie nešpecifickej reakcie konjugátu o rôznom stupni riedenia	87
5.4	Príprava imunosorbentu s následnou izoláciou exozómov na základe ich povrchových znakov a overenie jeho funkčnosti metódami SDS-PAGE a Semi-dry Western blot	88
5.5	Odstránenie abundantných proteínov zo séra pre optimalizáciu izolácie exozómov komerčným testom.....	91
5.5.1	Overenie deplécie HSA zo séra elúciou z komerčného magnetického nosiča metódou SDS-PAGE	92
5.5.2	Overenie nešpecifickej reakcie konjugátu s molekulovými markermi a HSA získaným depléciou zo séra metódami SDS-PAGE a Semi-dry Western blot.....	93
5.5.3	Izolácia exozomálnej frakcie komerčným testom z ľudského séra zbaveného abundantných proteínov.....	94
5.6	Hmotnostná analýza pre overenie prítomnosti exozómov vo vyizolovanej frakcii z ľudského séra metódou proteolytického štiepenia z gélu modifikovaným trypsínom	96
6	Zhrnutie výsledkov	98
7	Záver	100
8	Použitá literatúra	101

Zoznam skratiek

Ab	Protilátka (Antibody)
AFM	Mikroskopia atomárnych síl (Atomic Force Microscopy)
Ag	Antigén (Antigen)
APC	Antigén prezentujúca bunka (Antigen Presenting Cell)
DC	Dendritické bunky (Dendritic Cell)
DLS	Dynamický rozptyl svetla (Dynamic Light Scattering)
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
ESCRT	Cytosolický endozomálny triediaci komplex (Endosomal Sorting Complex Required for Transport)
EVs	Extracelulárne vezikuly (Extracellular vesicles)
GTPáza	Guanozíntrifosfatáza
HSP	Proteíny tepelného šoku (Heat Shock Proteins)
IA	Imunoafinita
ILVs	Intraluminálne vezikuly (Intraluminal vesicles)
Mf	Mikrofluidika (Microfluidic)
MM	Molekulový marker
MVBs	Multivezikulárne teieska (Multivesicular Bodies)
MVs	Mikrovezikuly (Microvesicles)
MW	Molekulárna hmotnosť (Molecular weight)
NK	Zabíjačské bunky (Natural killers)
NTA	Analýza sledovania nanočastíc (Nanoparticle Tracking Analysis)
PEG	Polyethylénglykol
PVDF	Polyvinylidénfluorid
RNA	Ribonukleová kyselina
RT	Izbová teplota (Room Temperature)
SDS-PAGE	Polyakrylamidová elektroforéza za prítomnosti dodecylsulfátu
SEC	Gélová permeačná chromatografia (Size Exclusion Chromatography)
SEM	Skenovacia elektrónová mikroskopia (Scanning Electron Microscopy)
TEXs	Exozómy odvodené od nádorov (Tumor-derived exosomes)

TEM	transmisná elektrónová mikroskopia (Transmission Electron Microscopy)
TM	Nádorové mikroprostredie (Tumor Microenvironment)
UC	Ultracentrifugácia (Ultracentrifugation)
UF	Ultrafiltrácia (Ultrafiltration)
WB	Western blot

Zoznam obrázkov a tabuliek

ZOZNAM OBRÁZKOV

Obrázok 1: Rozdelenie extracelulárnych vezikúl na základe veľkostí a pôvodu. Prevzaté a modifikované z [20]	22
Obrázok 2: Molekulárna stavba exozómu. Prevzaté a modifikované z [40]	26
Obrázok 3: Percentuálne zastúpenie jednotlivých tried proteínov v exozómoch. Prevzaté a modifikované z [47]	28
Obrázok 4: Biogenézia exozómov za účinnosti mechanizmu ESCRT. Prevzaté a modifikované z [31]	32
Obrázok 5: Schéma diferenciálnej UC pre izoláciu exozómov zo séra a moču. Prevzaté a modifikované z [93]	40
Obrázok 6: Kolóna naplnená sefarózou CL-2B pre izoláciu EVs z ľudskej plazmy [95]	43
Obrázok 7: A) Modifikovaný povrch magnetických častíc rôznymi funkčnými skupinami či biomolekulami ako špecifické Ab; B) Využitie modifikovaných magnetických častíc ako pevného nosiča pri izolácii molekúl z biologických tekutín. Prevzaté a modifikované z [120]	45
Obrázok 9: Porovnanie metód SEM (a) a TEM (b) pri zobrazení EVs z myších buniek melanómu [132]	48
Obrázok 10: Zobrazenie morfológie exozómov pochádzajúce zo slín pomocou AFM metódy [131]	49
Obrázok 11: Snímok exozómov z HEK bunkovej kultúry získaný metódou NTA [144]	51
Obrázok 12: Detekcia sérových exozómov (Exo) metódou Semi-Dry WB na základe prítomnosti špecifických proteínov s príslušnými molekulárnymi hmotnosťami po predošlej SDS-PAGE [87]	52
Obrázok 13: Príklad magneticky separujúceho Mf systému pre izoláciu a detekciu exozomálnej mRNA z krvi. Prevzaté a modifikované z [152]	54
Obrázok 14: Výsledok SDS-PAGE analýzy pre overenie účinnosti nosiča-SeraMag pre imobilizáciu nešpecifických protilátok anti-ľudských IgG	71
Obrázok 15: Výsledok SDS-PAGE analýzy pre overenie účinnosti nosiča BcMag Proteín G pre imobilizáciu nešpecifických protilátok anti-ľudských IgG	72
Obrázok 16: Výsledok SDS-PAGE analýzy pre overenie účinnosti nosiča BcMag Proteín A pre imobilizáciu nešpecifických protilátok anti-ľudských IgG	72
Obrázok 17: Výsledok SDS-PAGE analýzy pre porovnanie účinnosti nosičov SeraMag a BcMag Proteín G pre imobilizáciu špecifických monoklonálnych protilátok anti-CAI IgG ...	74
Obrázok 18: Výsledok SDS-PAGE analýzy porovnania účinnosti imunosorbentov SeraMag A BcMag-Proteín G s imobilizovanými špecifickými monoklonálnymi anti-CAI IgG po väzbe CAI s následnou elúciou	75
Obrázok 19: Výsledok analýzy WB pre porovnania účinnosti imunosorbentov SeraMag A BcMag-Proteín G s imobilizovanými špecifickými monoklonálnymi anti-CAI IgG po väzbe CAI s následnou elúciou	76
Obrázok 20: Výsledok SDS-PAGE analýzy pre overenie stability nosiča BcMag Proteín G pri prechode pH z 5,0 do 8,0	77
Obrázok 21: Výsledok SDS-PAGE analýzy pre overenie účinnosti optimalizácie premytia nosiča BcMag Proteín G premytím s 0,05% TFA)	77

Obrázok 22: Výsledok SDS-PAGE analýzy porovnania dvoch komerčných kitov pre izoláciu exozómov z ľudského séra.....	79
Obrázok 23: Výsledok analýzy WB pre overenie reakcie myších primárnych monoklonálnych anti-ľudských CD63 (A) a CD81 (B) s proteínmi CD63 a CD81 po izolácii z ľudského séra	80
Obrázok 24: Výsledok Dot blot analýzy overenia funkčnosti primárnych myších monoklonálnych anti-ľudských CD63 a CD81 protilátok pri reakcii s proteínmi CD63 a CD81 získaných z plazmocytárneho média RPMI, exozomálnej frakcie zo séra.....	81
Obrázok 25: Výsledok SDS-PAGE analýzy vplyvu prídavku močoviny (M) k vzorke čerstvého séra pred izoláciou exozomálnej frakcie komerčným kitom od firmy Invitrogen ...	83
Obrázok 26: Výsledok SDS-PAGE analýzy vplyvu prídavku močoviny (M) k vzorke mrazeného séra pred izoláciou exozomálnej frakcie komerčným kitom od firmy Invitrogen .	83
Obrázok 27: Výsledok WB analýzy vplyvu prídavku močoviny (M) k vzorke čerstvého séra pred izoláciou exozomálnej frakcie komerčným kitom od firmy Invitrogen	84
Obrázok 28: Výsledok WB analýzy vplyvu prídavku močoviny (M) k vzorke zmrazeného séra pred izoláciou exozomálnej frakcie komerčným kitom od firmy Invitrogen	85
Obrázok 29: Výsledok WB analýzy pre „rebinding“ Ab na overenie nešpecifickej reakcie konjugátu s molekulovým markerom bez prídavku primárnej polyklonálnej anti-CD63 protilátky.....	86
Obrázok 30: Výsledok WB analýzy pre „rebinding“ Ab na overenie nešpecifickej reakcie konjugátu s molekulovým markerom bez prídavku primárnej polyklonálnej anti-CD63 protilátky.....	86
Obrázok 31: Výsledok Dot blot analýzy overenia funkčnosti králičích polyklonálnych anti-ľudských CD63 IgG pri rôznom riedení v reakcii s proteínmi CD63 izolovaných z ľudského séra.....	87
Obrázok 32: Výsledok Dot blot analýzy overenia nešpecifickej skříženej reakcie konjugátu anti-králičích IgG-HRP pri rôznom riedení s proteínmi CD63 izolovaných z ľudského séra bez prídavku primárnej králičej polyklonálnej anti-CD63 protilátky	88
Obrázok 33: Výsledok SDS-PAGE analýza imobilizácie polyklonálnych králičích anti-ľudských CD63 IgG na nosič BcMag Proteín G	89
Obrázok 34: Výsledok SDS-PAGE účinnosti imunosorbentu BcMag-Proteín G s imobilizovanými polyklonálnymi králičími anti-ľudskými CD63 IgG pri väzbe exozomálnych proteínov CD63 s následnou elúciou.....	90
Obrázok 35: Výsledok WB analýzy účinnosti imunosorbentu BcMag-Proteín G s imobilizovanými polyklonálnymi králičími anti-ľudskými CD63 IgG pri väzbe exozomálnych proteínov CD63 s následnou elúciou.....	91
Obrázok 36: Výsledok SDS-PAGE analýzy deplecie HSA zo séra komerčným kitom od firmy Merck s následnou elúciou	92
Obrázok 37: Výsledok SDS-PAGE analýzy pre overenie deplecie HSA zo séra komerčným kitom od firmy Merck.....	93
Obrázok 38: Výsledok WB analýzy overenia nešpecifickej skříženej reakcie konjugátu s molekulovými markermi	94
Obrázok 39: Výsledok SDS-PAGE analýzy izolácie exozomálnej frakcie zo zmrazeného ľudského séra komerčným kitom od firmy Invitrogen po predchádzajúcej deplecii HSA komerčným kitom od firmy Merck.....	95
Obrázok 40: Výsledok WB analýzy pre overenie reakcie primárnych polyklonálnych králičích anti-ľudských CD63 IgG s exozomálnymi proteínmi vyizolovanými zo zmrazeného ľudského séra komerčným kitom od firmy Invitrogen po predchádzajúcej deplecii HSA zo séra	96

Obrázok 41: Vyhodnotenie dát získaných hmotnostnou spektrometriou analyzovanej vzorky po naštepení z gélu modifikovaným trypsínom pomocou Swiss-Prot databázy.97

ZOZNAM TABULIEK

Tabuľka 1: Objemy použitých roztokov pre prípravu gélov na SDS – PAGE.....	57
Tabuľka 2: Komerčné magnetické častice použité pre prípravu imunosorbentu.....	70
Tabuľka 3: Prehľad afínít Proteínu A a G pre jednotlivé druhy a triedy protilátok. Prevzaté a modifikované z [156]	73

0 ÚVOD

Procesy prebiehajúce v bunkách na molekulárnej úrovni sú veľmi komplikované no veľmi dôležité pre správne fungovanie celého organizmu. Bunky neustále medzi sebou komunikujú a vymieňajú si rozličné informácie o situáciách prebiehajúcich vôkol nich. Jedným z typov komunikácie medzi bunkami je uvoľňovanie extracelulárnych vezikúl do okolitého prostredia. Tieto vezikuly nesú rôzne informácie o rodičovských bunkách v podobe lipidov, proteínov ale aj nukleových kyselín akými sú mRNA, miRNA ba dokonca aj samotná DNA. Na základe toho možno zistiť poznatky o činnosti a stavu buniek nielen počas fyziologických ale aj patologických procesov prebiehajúcich v bunkách.

Predmetom záujmu tejto diplomovej práce sú exozómy patriace do skupiny extracelulárnych vezikúl. Za posledné roky sa exozómy ukázali byť veľkým prínosom pri diagnostike ale aj kontrole liečby rakovinových ochorení. Keďže ich prítomnosť bola dokázaná v takmer všetkých biologických tekutinách, izolácia týchto vezikúl nie je náročná na materiál. Najčastejšie sa získavajú z ľudskej krvi, konkrétne plazmy či séra ale aj z moču, slín i plodovej vody. Je mnoho spôsobov izolácie exozómov ako napríklad klasické prístupy ultracentrifugácie, ultrafiltrácie či v tomto prípade imunoprecipitačné a imunoafinitné metódy v podobe magnetickej separácie.

Po izolácii je nutné dokázať a charakterizovať prítomnosť týchto vezikúl vo vzorkách najčastejšie pomocou prítomných proteínov na ich povrchu, ktoré slúžia ako diagnostické markery. Podobne ako pri izolácii, tak aj pri detekcii existuje celá rada prístupov. Medzi najpoužívanejšie patria mikroskopické metódy alebo postupy založené na imunoanalýze akým je napríklad blotting rozdelených proteínov SDS-PAGE na nitrocelulózu membránu. Tento spôsob detekcie exozómov bol používaný aj pri pokusoch v tejto práci. Medzi novšie a modernejšie prístupy patria mikrofluidné systémy v podobe mikročipov šetriace náklady, čas ale hlavne biologický materiál.

1 Medzibunková komunikácia

Medzibunková komunikácia je základným znakom mnohobunkových organizmov a hrá dôležitú úlohu v rozvoji nielen fyziologických procesov ale aj chorobných, akými sú napríklad aj autoimunitné, metabolické či dokonca nádorové ochorenia. Schopnosť buniek prijímať signály od susedných buniek a správne reagovať na svoje okolité mikroprostredie je rozhodujúca pre včasný vývoj, imunitu a normálnu homeostázu a remodeláciu tkanív [1]. Klasické metódy medzibunkovej komunikácie sprostredkované interakciami bunka-bunka alebo bunka-matrix zahŕňajú väzbu membránových proteínov, vyplavovanie signálnych molekúl a tesné spoje. Predpokladalo sa že bunky komunikujú medzi sebou najmä prostredníctvom vylučovania solubilných faktorov. Príkladom sú chemokíny, cytokíny, rastové faktory a špecifické povrchové receptory buniek [2]. Za posledné desaťročia sa objavil nový mechanizmus komunikácie, pri ktorom sa proteíny, lipidy a dokonca aj nukleové kyseliny fyzicky vymieňajú medzi bunkami v procese medzibunkového prenosu (Intercellular Transport, ICT). Bunkovú komunikáciu prostredníctvom ICT sprostredkuje rozmanitý súbor mechanizmov. V súčasnosti boli opísané dva hlavné podtypy ICT na základe toho, či je potrebné priame fyzické spojenie medzi bunkami. Mechanizmy prenosu závislé od kontaktu zahŕňajú použitie membránových mostíkov, bunkovú fagocytózu alebo trogocytózu a kombináciu endocytózy a proteolýzy proteínov. V súčasnosti existuje iba jeden mechanizmus ICT, v ktorom sa môže uskutočniť preprava nákladu medzi bunkami, ktoré nie sú v priamom kontakte. Tento typ prenosu vyžaduje uvoľnenie materiálu v membránovo viazanej vezikulárnej štruktúre, ako sú extracelulárne vezikuly (Extracellular Vesicles, EVs) [1; 3; 4].

1.1 Vezikulárny transport proteínov

Aby bunka správne fungovala, jej rôzne kompartmenty musia navzájom komunikovať, čo je sprostredkované vezikulárnym transportom. Bunky cicavcov vylučujú proteíny z biosyntetickej dráhy exocytózou sekrečných vezikúl alebo regulovaným uvoľňovaním sekrečných či uskladnených granúl na základe fyziologických stimulov. Prekursori solubilných proteínov obvykle obsahujú N-terminálne signálne peptidy, ktoré ich smerujú do translokačného aparátu endoplazmatického retikula (ER) a nasleduje tak vezikulárny transport z ER cez Golgiho aparát (GA) na povrch buniek, kde sa nachádzajú luminálne proteíny vrátane sekrečných solubilných proteínov. Takto sú proteíny uvoľňované do extracelulárneho prostredia fúziou sekrečných vezikúl odvodených z GA s plazmatickou membránou [5]. Vezikuly sa nepohybujú náhodne

v bunke, ale riadeným mechanizmom. Do tohto mechanizmu sa zapájajú kľúčoví hráči, ktorí sprostredkovávajú ICT vezikúl. Jedným zo spôsobov ako to dosiahnuť je, že vezikuly v bunke neustále cirkulujú. Formujú sa z jednej membrány a spájajú sa s druhou, čo je prísne regulované [6; 7]. V posledných niekoľkých desaťročiach sa dosiahol obrovský pokrok pri identifikácii molekulárneho mechanizmu, ktorý riadi a reguluje dráhy membránového obchodovania. Každá transportná dráha vezikúl zahŕňa pučanie vezikúl z donorovej membrány, po ktorom nasleduje transport na správnu akceptorovú membránu. Aj keď je o týchto procesoch veľa vieme, to ako vezikula s príslušným nákladom rozpozná partnerskú membránu zostáva záhadou. Dynamické štruktúry cytoplazmatických obalových proteínov, ktoré cykľujú na a mimo membrán, sa podieľajú na triedení nákladu a sprostredkujú pučanie vezikúl [6; 8]. V ďalšom kroku po pučení sa vezikuly transportujú motorickými proteínmi (kinezín, dyneín a myozín) pozdĺž mikrotubulov a aktín-cytoskeletálnych elementov k akceptorovým membránam [9].

Posledným krokom v transporte vezikúl je spojenie: počiatočná interakcia medzi donorovými vezikulami s partnerskou vezikulárnou / akceptorovou membránou, vedúca k tvorbe membránovej fúzie sprostredkovanej komplexmi SNARE. Proteíny z rodiny Rab koordinujú tieto transportné udalosti vezikúl a zabezpečujú ich presnosť. Faktory ovplyvňujúce spájania interagujú s príslušnými Rab proteínmi, aby tak zabezpečili priblíženie donorovej membrány s vhodnou akceptorovou membránou a napokon došlo k ich fúzii [6; 10]. Ďalšia možná dráha pre export proteínov zahŕňa endocytárnu cestu a fúziu multivezikulárnych teliesok (Multivesicullar Bodies, MVBs) s plazmatickou membránou, ktorú popísali Pan a Johnstone pred vyše 25 rokmi pri dozrievaní ovčích retikulocytov [11; 12; 13].

1.2 Extracelulárne vezikuly

Pri pozorovaní medzibunkového priestoru elektrónovým mikroskopom bolo často vidieť malé častice, ktorých existencia sa prikladala poškodeniu okolitých buniek akým je nekróza. Po zistení, že k uvoľňovaniu týchto častíc dochádza pri špecifických procesoch, sa pohľad na ich význam zmenil [4]. EVs boli pôvodne považované len za odpadové produkty buniek [14]. Za posledné roky sa však ukázali EVs ako silný sprostredkovateľ medzibunkovej komunikácie nielen u prokaryot ale aj eukaryot. To najmä vďaka ich schopnosti transportovať rôzne proteíny, lipidy, nukleové kyseliny a tým ovplyvňovať nielen fyziologické ale i patologické pochody v bunkách [15]. Bunky nepoužívajú iba vezikulárne a tubulovezikulárne transportné nosiče na dodávanie nákladu medzi membránami v bunke, ale tiež vytvárajú

vezikuly sekretované do extracelulárneho priestoru. Predpokladá sa, že tieto extracelulárne membránové častice fungujú ako „dopravná linka“ na dodávanie nákladu medzi rôznymi bunkami v organizme. Vezikuly nachádzajúce sa v extracelulárnom priestore buniek, sú rozmanité a závisia od pôvodu buniek a ich súčasného stavu [16].

1.2.1 História objavenia existencie extracelulárnych vezikúl

Prvá a najvýznamnejšia štúdia preukazujúca existenciu EVs bola uverejnená už v roku 1946. De Broe v roku 1977 opísal uvoľňovanie týchto „membránových fragmentov“ ako znak životaschopných buniek. Až do začiatku osemdesiatych rokov sa tieto „fragmenty“ považovali za „prach“ doštičiek alebo zvyšky buniek, ktoré priamo pochádzali z plazmatickej membrány. V roku 1983 priekopníci Pan, Stahl, Harding a Johnstone, prispeli k hlavnému objavu, že transferínové receptory spojené s malými 50 nm vezikulami sa uvoľňovali z dozrievajúcich krvných retikulocytov do extracelulárneho priestoru procesom endocytózy a recyklácie sprostredkovejanej receptormi. Čím objavili komplexný model sekrécie EVs, zatiaľ čo študovali stratu transferínu počas dozrievania retikulocytov v krvnom obehú [11; 12; 13; 17]. Tento výraz sa však tiež používal na označenie iných fragmentov membrány známych ako „exozómové komplexy“, ktoré boli izolované z biologických tekutín a ich veľkosť sa pohybovala od 40 do 1 000 nm [17].

1.2.2 Vznik extracelulárnych vezikúl

Ako už bolo spomínané, na začiatku osemdesiatych rokov vedci Pan, Stahl a Johnstone objavili podstatu sekrécie EVs. Domnievali sa, že EVs sú formované priamo z fragmentov plazmatickej membrány, ktoré boli izolované z kultivovaných buniek a ľudských telesných tekutín [11; 12]. Niektoré EVs sa formujú priamo po uvoľnení z plazmatickej membrány buniek (PM), akými sú napr. aktivované alebo apoptózou indukované mikrovezikuly. Naopak je to pri vnútorných vezikulách, nazývaných aj nanovezikuly s veľkosťou 30 – 200 nm, vytvárajúcich sa v multivezikulárnych endozomálnych kompartmentoch, ktorými sú napr. MVBs. K tomuto javu dochádza pri fúzii týchto kompartmentov s plazmatickou membránou, čím dochádza k vyplaveniu takýchto vezikúl, akými sú exozómy, do extracelulárneho priestoru. Pravdou je, že EVs sú pomerne heterogénnou skupinou. Je to z toho dôvodu, že vykazujú rozdielne znaky, závisiace nielen od mechanizmu ich sekrécie ale aj buniek, z ktorých pochádzajú [18; 19]. Takmer všetky typy buniek uvoľňujú EVs prítomných v plazme, ako aj v iných telesných tekutinách vrátane materského mlieka, spermií, slín, moču a spúta. EVs sa zúčastňujú dôležitých biologických funkcií a pôsobia ako mechanizmus komunikácie medzi bunkami. Táto

medzibunková komunikácia môže byť sprostredkovaná mediátormi exprimovanými na povrchu EVs alebo transportovanými v ich lúmene [15].

1.2.3 Rozdelenie extracelulárnych vezikul

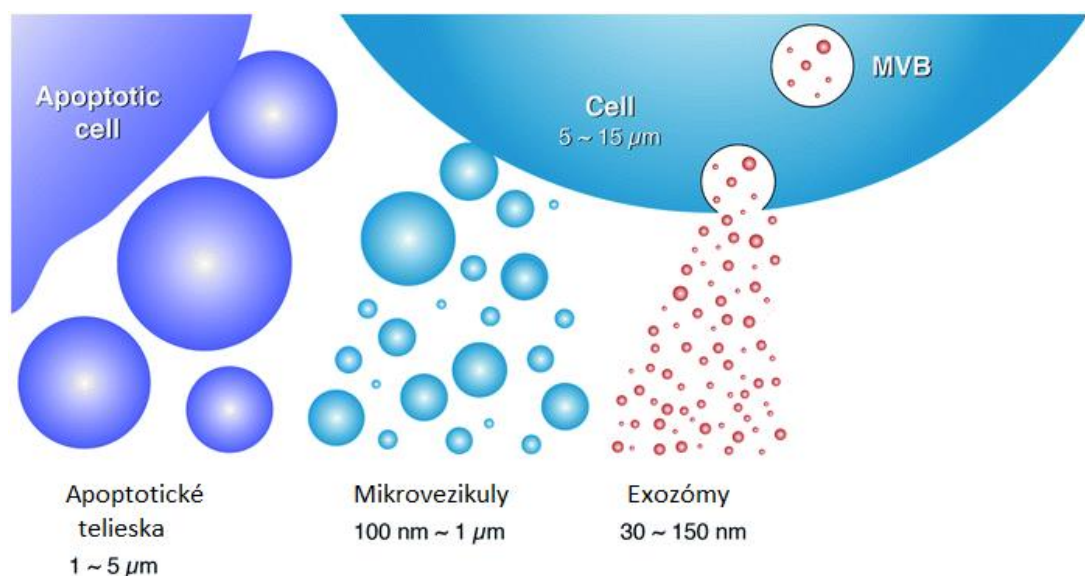
EVs prenášajú molekuly, ako sú nukleové kyseliny, proteíny a lipidy, do špecifických cieľových buniek a možno ich klasifikovať podľa ich veľkosti, biogenézy, funkcií a zloženia. Existujú tri hlavné typy EVs vid' *Obrázok 1* [20]:

- (1) mikrovezikuly (priemer 100 - 1 000 nm);
- (2) apoptotické telieska (priemer 1 000 - 5 000 nm);
- (3) exozómy (priemer 30 - 150 nm).

Prvé dve skupiny predstavujú heterogénne populácie vezikul generovaných ektocytózou, pučaním plazmatickej membrány smerom von z bunky. Exozómy sa namiesto toho vytvárajú zaškrtením endozomálnych membrán a následnou produkciou MVBs [21]. Mikrovezikuly (MVs) o veľkosti od 100 nm do 1 μ m sú vylučované plazmatickou membránou živých buniek. Tieto MVs bývajú pomenované aj ako mikročastice, onkozómy či ektozómy v závislosti od zdroja buniek alebo výskumnej oblasti [22; 23]. MVs boli prvýkrát identifikované v roku 1967 P. Wolfom, ktorý popisoval prokoagulačné deriváty doštičiek, pôvodne pomenované „prach z doštičiek“ v súčasnosti označované ako mikročastice získané z doštičiek [24]. Aj keď presná definícia MVs nie je jednoznačná, bežne sa opisujú ako heterogénna populácia sférických štruktúr, uvoľňovaných ektocytózou mechanizmom podporovaným cytoskeletálnou prestavbou. Je o nich známe, že exprimujú antigén špecifické povrchové molekuly odpovedajúce ich rodičovským bunkám. Táto charakterizácia umožňuje ich odlíšenie od exozómov, ktoré budú podrobne rozobrané v kapitole 2, a presnú identifikáciu ich bunkového pôvodu [22; 25].

Apoptóza je hlavnou formou bunkovej smrti za normálnych fyziologických podmienok. V neskorších štádiách apoptózy môžu bunky generovať subcelulárne membránovo viazané EVs (ApoEVs) [26]. Podobne ako exozómy a MVs, aj ApoEVs sa klasifikujú ako typ EVs, ktoré sa môžu vytvárať z mnohých (ale nie všetkých) typov buniek vrátane T buniek, monocytov, fibroblastov, endoteliálnych a epitelových buniek [27]. Podtypy ApoEVs zahŕňajú veľké membránovo viazané vezikuly, akými sú napríklad apoptotické telieska (ApoBDs) alebo menšie apoptotické mikrovezikuly (ApoMVs) o priemere $<1 \mu$ m. Tvorba ApoEVs má dve kľúčové funkcie: napomáhanie odbúraniu apoptotických buniek fagocytmi a prostriedok medzibunkovej komunikácie [26]. Signály pre apoptózu sú prenášané prostredníctvom

signalizačných dráh, ktoré nakoniec vedú k aktivácii kaspáz zodpovedných za vykonávanie deštrukcie buniek. Napriek mnohým odlišnostiam v rôznych dráhach, výsledkom je vytvorenie ApoBDs, ktoré sú napokon pohltené fagocytmi, akými sú napr. neutrofil, makrofág a dendritická bunka (Dendritic Cell, DC). To vedie ku konečnej degradácii v procese známom ako efferocytóza. Súčasné poznatky ukazujú, že ApoBDs obsahujú zvyšky apoptotických buniek, t.j. cytoplazmu, organely, DNA, mikroRNA, proteíny a lipidy. Pričom obsah apoptotických buniek je náhodne distribuovaný do každého apoptického telieska. Preto môže byť konkrétna organela alebo jadrový obsah prítomný v konkrétnych ApoBDs [28]. Aj keď sú menej známe mechanizmy, ktoré riadia tvorbu ApoBDs v porovnaní s inými typmi EVs, nedávne štúdie naznačujú, že ide o vysoko regulovaný proces a bol podrobne prehodnotený. Generácia ApoBDs je riadená niekoľkými odlišnými morfológickými krokmi, procesom známym ako „demontáž apoptotických buniek“ [26]. Demontážny proces možno rozdeliť do troch kľúčových krokov: 1. krok – tvorba plazmatických membránových membrán na povrchu bunky, 2. krok – generovanie apoptotických membránových výstupkov a 3. krok je fragmentácia, ktorá vedie k tvorbe jednotlivých ApoBDs. Tieto kroky sú regulované rôznymi molekulárnymi faktormi, ako je Rho-asociovaná proteínkináza ROCK1 a plazmatický membránový kanál pannexin 1 (PANX1) [27; 29].



Obrázok 1: Rozdelenie extracelulárnych vezikúl na základe veľkostí a pôvodu. Prevzaté a modifikované z [20]

1.2.4 Štruktúra extracelulárnych vezikúl

Ukázalo sa, že EVs ovplyvňujú nielen susedné ale aj vzdialené cieľové bunky indukciou intracelulárnej signalizácie prostredníctvom väzby na receptory alebo prenosom nových charakteristických štruktúr, v podobe receptorov, enzýmov alebo dokonca genetického materiálu z vezikúl a podieľajú sa tak aj na patogenéze viacerých chorôb [2; 22; 30]. Obsah proteínov rôznych typov EVs do značnej miery odráža obsah rodičovských buniek a je obohatený o určité molekuly vrátane adhézných, molekúl transportujúcich membránu, molekúl cytoskeletu, proteínov tepelného šoku, cytoplazmatických enzýmov, proteínov transdukcie signálu, cytokínov, chemokínov, proteináz a antigénov špecifických pre bunky. EVs navyše obsahujú mediátorovú RNA (mRNA), nekódujúcu RNA (ncRNA) vrátane miRNA a dokonca aj extrachromozomálnu DNA [15]. Membránové proteíny, o ktorých je známe, že sa zhlukujú v mikrodoménach plazmatickej membrány alebo na endozómoch, sú tiež často obsiahnuté v EVs. Zahŕňajú tetraspaníny, rodinu, kam sa radí viac ako 30 proteínov zložených zo štyroch transmembránových domén. Tetraspaníny, ako napríklad CD63, CD81, CD82, CD53 a CD37 boli prvýkrát identifikované v B lymfocytárnych exozómoch. V nich môžu byť obohatené viac ako 100-násobne v porovnaní s transferínovým receptorom, ktorý sa v tomto type buniek môže považovať za pravý marker plazmatickej membrány, taktiež skorého endozómu. Iné štúdie potvrdili, že tieto tetraspaníny prítomné v EVs pochádzajú aj z iných zdrojov buniek. V porovnaní s plazmatickou membránou sú EVs z rôznych buniek vysoko obohatené o cholesterol, sfingomyelín a hexosylceramidy na úkor fosfatidylcholínu a fosfatidyletanolamínu [1].

1.2.5 Význam extracelulárnych vezikúl

Takmer všetky typy buniek uvoľňujú EVs, ktoré sa zúčastňujú dôležitých biologických funkcií a pôsobia ako typ komunikácie medzi bunkami [15]. V súčasnosti sa uznáva, že EVs hrajú dôležitú úlohu pri takmer všetkých fyziologických činnostiach vyskytujúcich sa v tkanivách a orgánoch. Najintenzívnejšie sa skúmajú aj ich úlohy v imunológii, konkrétne: ich modulácia v lymfocytoch a makrofágoch. Taktiež aj v srdci a cievach s ohľadom na stimuláciu koagulácie, angiogenézy. Je zaujímavé, že mechanizmus zapojený do mnohých z týchto procesov je výmena RNA, vyskytujúca sa medzi bunkami prostredníctvom "obchodovania" s nákladom EVs [22; 31]. Funkcie EVs vo fyziologických a patologických procesoch závisia od schopnosti EVs interagovať s recipientnými bunkami pri dodávaní ich obsahu proteínov, lipidov a RNA [15]. Špecifickosť cieľovej bunky pre väzbu exozómov (alebo iných EVs) je pravdepodobne určená adhéznymi molekulami, ako sú integríny prítomné v EVs. Napríklad T bunky môžu

získavať exozómy odvodené z DC obsahujúce MHC II, ktoré sa uvoľňujú v reakcii na príbuzné interakcie DC s T bunkami. Získanie týchto exozómov vyžadovalo aktiváciu T lymfocytov, čo ale bolo závislé skôr od indukovaného vysoko-afinitného stavu LFA-1, a nie na špecifickosti receptora T buniek. Exozómy nesúce na svojom povrchu molekuly MHC II a ICAM-1 zo zrelých DC sa môžu získavať aj pomocou okolitých DC prostredníctvom LFA-1 [1; 31].

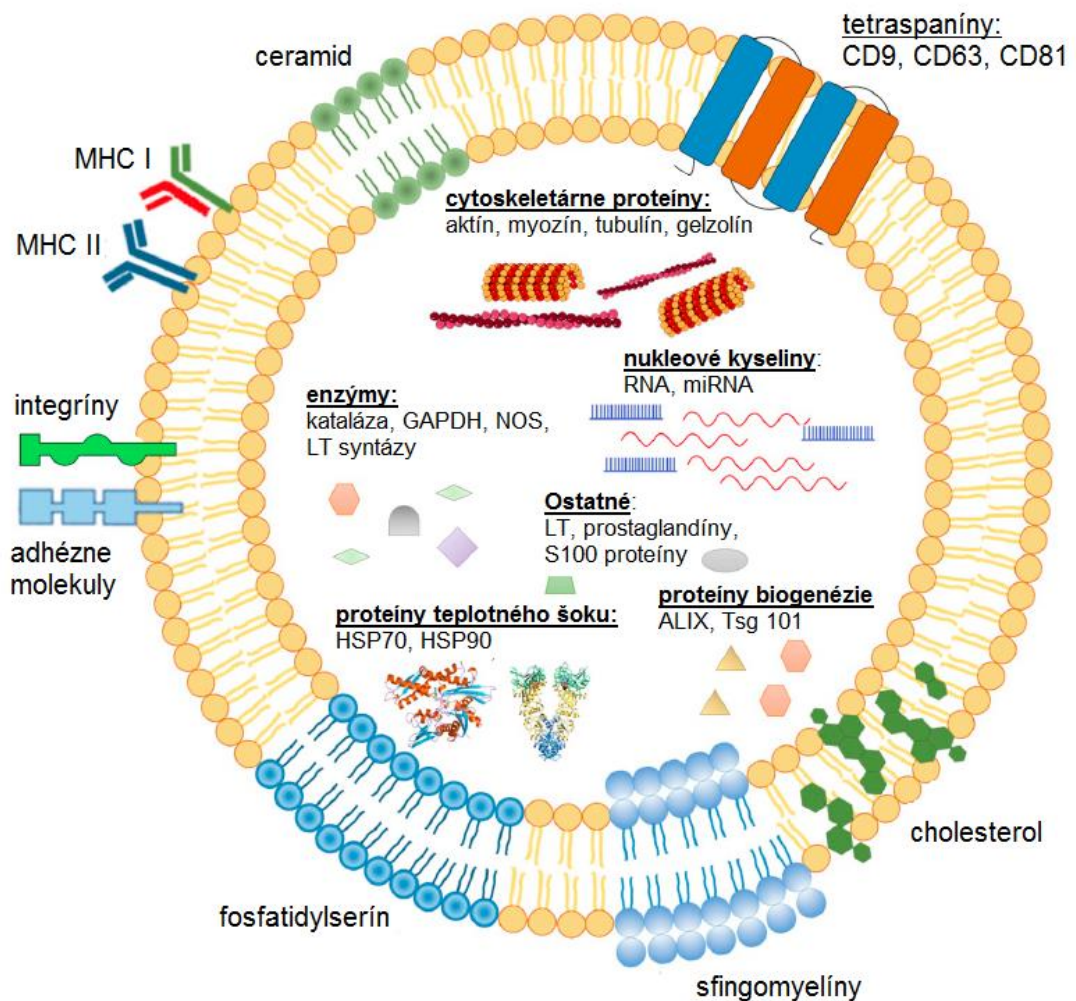
2 Exozómy

Ako už bolo spomínané v predchádzajúcej kapitole, exozómy patria do skupiny EVs. Sú klasicky definované svojou veľkosťou, podobnou veľkosti intraluminálnych vezikúl MVBs (t.j. pod priemerom 150 nm) a ich obsahom proteínov spojených s endozómami. Termín exozóm sa však často používa v literatúre pre EVs malej veľkosti, ktoré prechádzajú pórovými filtrami o veľkosti 220 nm [32]. Sú to teda vezikuly v rozmedzí od 30 do 100 nm s hustotou 1,10 - 1,18 g / ml [5; 20; 33]. Exozómy, ako bolo spomínané v kapitole o vzniku EVs, boli prvý krát popísané v retikulocytoch behom maturácie červených krviniek, kde umožňujú remodeláciu plazmatickej membrány a sprostredkovávajú odstránenie transferínového receptora [11; 12; 13; 34; 35]. V roku 1980 sa exozómy považovali za jednotky na likvidáciu bunkového odpadu, ktoré sprostredkovali nový mechanizmus komunikácie medzi bunkami. Neskôr bol tento termín prijatý pre vezikuly o veľkosti 40 – 100 nm, ktoré sú uvoľňované počas diferenciácie retikulocytov v dôsledku fúzie multivesikulárneho endozómu (Multivesicular Endosome, MVE) s plazmatickou membránou. Nakoniec sa o desať rokov neskôr sa zistilo, že exozómy sú uvoľňované aj B a T bunkami či DC, žírnymi a epitelovými bunkami čreva, neurónmi a dokonca aj nádorovými bunkami podobným mechanizmom. Ich prítomnosť bola dokázaná takmer vo všetkých biologických tekutinách akými sú krv, moč, materské mlieko, mozgomiešny mok a iných exudátoch [17; 36; 37; 38].

2.1 Štruktúra exozómov

Exozómy sa považujú za mini verziu ich rodičovských buniek a to z dôvodu zložitej architektúry exozómov z hľadiska obsahu proteínov, lipidov, nukleových kyselín a príslušného obsahu, ktorý vysoko závisí od súčasného stavu pôvodného typu bunky. Veľké množstvo konštitutívnych elementov v exozómoch bolo indentifikované z rôznych typov buniek vrátane okolo 4400 proteínov, 14 lipidov, 1639 molekúl mRNA a 764 miRNA, ktoré ilustrujú ich zložitosť a širokú škálu funkcií [12; 39]. Exozómy, ako je možné vidieť na *Obrázku 2*, sú obalené fosfolipidovou dvojvrstvou a na základe ich rozmanitého obsahu sa dajú rozlíšiť medzi sebou [40]. Vysoko výkonné proteomické analýzy exozómov odhalili prítomnosť proteínov extracelulárneho matrixu a bunkového povrchu, ako sú kolagény, integríny a galektín, receptory bunkového povrchu, ako je napríklad receptor B rastového faktora odvodeného z krvných doštičiek a receptor epidermálneho rastového faktora (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR), signálne molekuly a intracelulárne cytoskeletálne komponenty plus

metabolické enzýmy a G-proteíny, glykoproteíny hlavného histokompatibilného komplexu I a II (Major Histocompatibility Complex, MHC) [5; 36]. Lipidové zloženie exozómov nie je úplne charakterizované, ale je zrejmé, že na rozdiel od svojich buniek pôvodu sú exozómy obohatené o cholesterol, ceramid, fosfoglyceridy, z ktorých všetky môžu poskytovať štrukturálnu stabilitu. Okrem toho, že exozómy obsahujú RNA, môžu obsahovať aj jednovláknovú (ssDNA), genomovú (gDNA), chromozomálnu DNA (cDNA) a transponovateľné prvky [36; 41].

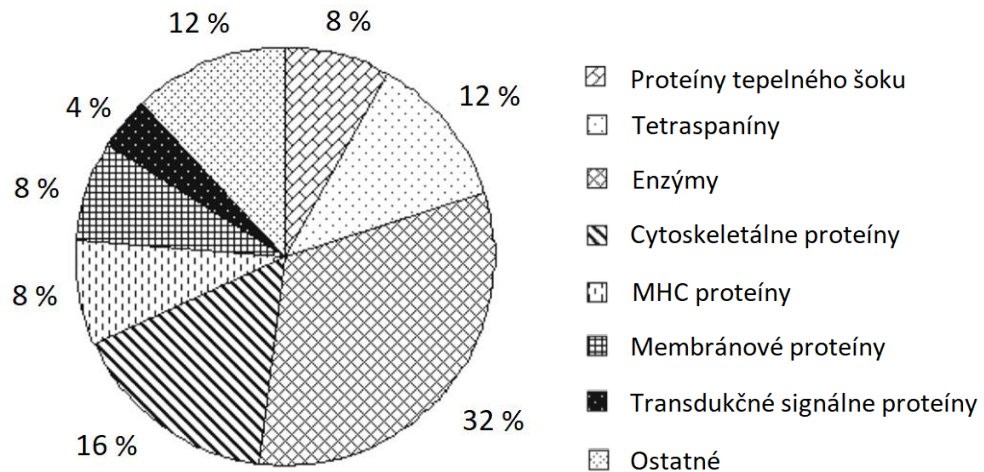


Obrázok 2: Molekulárna stavba exozómu. Prevzaté a modifikované z [40]

2.1.1 Proteínová zložka

Aj keď sa lipidom čo raz viac priznáva, že zohrávajú dôležitú úlohu pri exozomálnej funkcii, proteíny spojené s exozómami sú taktiež potrebné. Takéto proteíny sa môžu aktívne zúčastňovať na regulačných procesoch a spúšťať bunkové reakcie. Okrem iného sú nevyhnutne zapojené do funkčných aspektov exozómov, ako je napríklad interakcia s extracelulárnym matrixom, či väzba a fúzia s cieľovými bunkami [42]. Ako už bolo spomínané

v predchádzajúcej kapitole, exozómy sú vysoko bohaté na proteíny s rozličnými funkciami akými sú napríklad tetraspaníny zohrávajúce úlohu v invázii, penetrácii a pri fúziách buniek. Tetraspaníny, radené k transmembránovým proteínom, sú bežne detegované v exozómoch. Do tejto rodiny patria CD9, CD37, CD63, CD81 a CD82, ktoré sú na ich povrchu nadmerne exprimované a preto slúžia ako potenciálny exozomálny diagnostický marker. Niektoré tetraspaníny sú bohatšie zastúpené v exozómoch ako v ich rodičovských bunkách. Príkladom je tetraspanín CD9, ktorého prítomnosť bola desaťnásobná pri exozómoch pochádzajúcich z DC. Tetraspaníny bývajú hojne detegované pri exozómoch odvodených z B-lymfocytov [16; 38; 43; 37]. Ďalej sem patria proteíny tepelného šoku (Heat Shock Proteins, HSP) HSP70, HSP90, zodpovedné za prezentáciu a väzbu antigénu. Proteín tepelného šoku HSP70 konkrétne vyžaduje, aby sa fosfatidylserín z endozomálnej membrány zúčastnil na procese vytvárajúcom exozómy. Do proteínovej zložky sa radia adhézne proteíny ako ICAM-3 (CD50) ale aj proteíny pre formovanie MVBs akými sú anexíny a Rab, podieľajúce sa na sekrécii a transporte exozómov [16; 44]. Medzi tieto proteíny možno zaradiť i určité členy zapojené do biogenézie exozómov ako napríklad Alix, flotillin, a TSG101, čím sa exozómy odlišujú od ektozómov uvoľňovaných pri vylučovaní plazmatickej membrány, zatiaľ čo iné proteíny, špecificky obohatené v exozómoch, sa široko používajú ako exozomálne markery (napr. TSG101, HSP70, CD81 a CD63) [39]. Proteín Alix je asociovaný s ESCRT-III a viaže polyglycerofosfolipidový bismonoacylglycerofosfát (BMP), ktorým sú špecificky obohatené endozómy a lyzozómy [45]. Pre zhrnutie ako navrhuje Mathivanan a kol. vid' *Obrázok 3*, najčastejšie sa vyskytujúce exozomálne proteíny sa dajú rozdeliť do niekoľkých funkčných skupín: enzýmy (32%), najmä rodina Rab GTPáz, uľahčujúce dokovanie a fúziu membrán; cytoskeletálne proteíny (16%), ako je tubulín a aktín; HLA antigény, najmä MHC I a II; proteíny tepelného šoku (8%), ako je Hsp70, Hsp90; proteíny signálnej transdukcie (4%) laktadherín a ďalšie [46; 47].



Obrázok 3: Percentuálne zastúpenie jednotlivých tried proteínov v exozómoch. Prevzaté a modifikované z [47]

2.1.2 Lipidová zložka

Zdá sa, že lipidová vrstva cirkulujúcich exozómov je zložená najmä z lipidov tvoriacich plazmatickú membránu, vrátane sfingomyelínu, fosfatidylcholínu, fosfatidyletanolamínu, fosfatidylserínu, gangliozidu GM3 a fosfoinozitolu [1]. Vo všeobecnosti sa exozómy sú bohatšie na sfingomyelíny, cholesterol, GM3 a fosfatidylserín v porovnaní s ich rodičovskými bunkami. Sfingomyelín a cholesterol sú spojené vodíkovými väzbami, čoho výsledkom je tesný spoj sfingomyelín – cholesterolová dvojvrstva a nízka permeabilita pre vodu. Takto poskytujú odolnosť voči detergentom. GM3 môže hrať úlohu ako stabilizátor exozomálnej steny a chrániť vezikuly proti interakcii so zložkami v krvnom riečisku. Biologická rola fosfatidylserínu sa môže líšiť čo sa týka vezikulárnej populácie a zdrojov buniek [42]. Okrem fosfolipidov fosfatidylserínu (PS) a BMP, ceramid spúšťa dráhu exozomálnej biogenézie, nezávislú od mechanizmu ESCRT [41]. Cholesterol zvyšuje sekréciu exozómov pozitívnych na flotillín-2. Okrem toho sa lipidové transportéry, ako napríklad ABCA3 transportujúce fosfatidylcholín, tak isto sa podieľajú na syntéze exozómov. Bismonoacylglycerolfosfát (Bismonoacylglycerophosphate, BMP) je polyglycerofosfolipid, ktorého umiestnenie v bunkách je obmedzené na MVBs a lyzozómy. Z toho vyplýva, že BMP je potrebný pre ich tvorbu a následne na biogéniu ILVs. Okrem iného BMP viaže Alix proteín, ktorý je súčasťou mechanizmu ESCRT a chaperónový proteín HSP70. Obsah BMP a prítomnosť proteínu Alix interagujúceho s BMP sú rozhodujúce pre obsah cholesterolu u MVBs. IVLs zhromažďujú cholesterol už počas ich tvorby z endozomálnej membrány a tak následne sú exozómy bohatšie

na obsah cholesterolu na rozdiel od rodičovských buniek. Komplexy ESCRT indukujú laterálnu separáciu lipidovej fázy a vytvárajú usporiadané membránové mikrodomény za predpokladu, že cholesterol predstavuje viac ako 10% membránových lipidov. Cholesterol sa môže zaviesť do endozómov a na ILVs pomocou špeciálnych transportérov, ako je ABCG1, ktorý bol pozorovaný v neskorých endozómoch [45].

2.1.3 Nukleové kyseliny

Objav schopnosti APC vylučovať exozómy svojou vlastnou imunostimulačnou aktivitou zmenil prístup vedeckého sveta k vezikulám tohto typu. V roku 2007 Valadi a kol. ukázali, že exozómy sú schopné niesť široký súbor RNA [39; 48]. Okrem vybraných proteínov či lipidov exozómy obsahujú aj rôzne vzory RNA, ktoré sa môžu začleniť do recipientných buniek. Dnes sa už vie, že okrem mRNA a mikroRNA (skrátene miRNA) sú ďalšie triedy RNA prenášané exozómami: tRNA, rRNA, snRNA, snoRNA, piRNA a scaRNA. V súčasnosti existujú priame údaje naznačujúce, že exozómy nesú viac ako 750 miRNA a 1500 mRNA. Ich zloženie v mikročasticiach závisí od typu biologickej tekutiny a stavu tela [47; 49; 50]. Analýza RNA sekvenovaním ukázala, že mikroRNA boli najčastejšie zastúpené z exozomálnych druhoch RNA pochádzajúcich z ľudskej plazmy. Akonáhle sú miRNA zabalené do exozómov, môžu prejsť jednosmerným prenosom medzi bunkami, čo vedie k vytvoreniu medzibunkovej dopravnej siete, ktorá zase vyvoláva prechodné alebo pretrvávajúce fenotypové zmeny u recipientných buniek. Vďaka štruktúre exozomálnej membrány je miRNA chránená pred degradáciou RNáz. Vďaka čomu sa exozomálna miRNA stala v posledných rokoch horúcou témou [51]. Typy miRNA, ako miRNA-214, miRNA-29a, miRNA-1, miRNA-126 a miRNA-320, ktoré sa zúčastňujú angiogenézy, hematopoézy, exocytózy a tumorgenézy, už boli zaznamenané v exozomálnej bunkovej komunikácii [39]. Profil RNA exozómov sa líši od profilu bunkovej RNA, pretože exozómy obsahujú hlavne krátku RNA, ako je mRNA a miRNA a malú, či dokonca žiadnu ribozomálnu RNA. Ďalej, najviac obohatené RNA v exozómoch nie sú najhojnejšie zastúpené RNA v produkujúcej bunke, čo naznačuje triedenie špecifickej mRNA a miRNA do lúmenu exozómov. Mechanizmus tohto triedenia ešte nie je známy, ale ukázalo sa, že RNA-indukovaný tlmiači komplex (RISC) potrebný pre miRNA a malú interferujúcu RNA (siRNA) na inhibíciu mRNA je spojený s endozomálnou cestou [52].

Podľa niektorých autorov, okrem toho, že exozómy obsahujú rôzne druhy RNA, tieto mikrovezikuly uvoľňované nádorovými bunkami, ako už bolo spomínané, môžu obsahovať aj ssDNA, gDNA, cDNA [36]. Thakur a kol. preukázali, že použitím enzýmov, ktoré špecificky štiepia dvojvláknovú DNA (dsDNA) a ssDNA, je väčšina DNA obsiahnutá v exozómoch

v podobe dsDNA [53]. V posledných rokoch Takahashi a kol. zistili, že inhibícia sekrécie exozómov normálnymi bunkami viedla k akumulácii fragmentov jadrovej DNA, čo spôsobilo starnutie buniek a indukciu apoptózy [54]. To naznačuje, že akumulácia škodlivých fragmentov DNA v cytoplazme sa uvoľňuje do vonkajšieho prostredia pomocou exozómov a exozómy prispievajú k udržiavaniu bunkovej homeostázy [55]. Aj keď existujú správy naznačujúce, že DNA je zapuzdrená v exozómoch, Kawamura a kol. ukázali, že DNA je prítomná na povrchu exozómov a je potrebné objasniť význam jej lokalizácie [48].

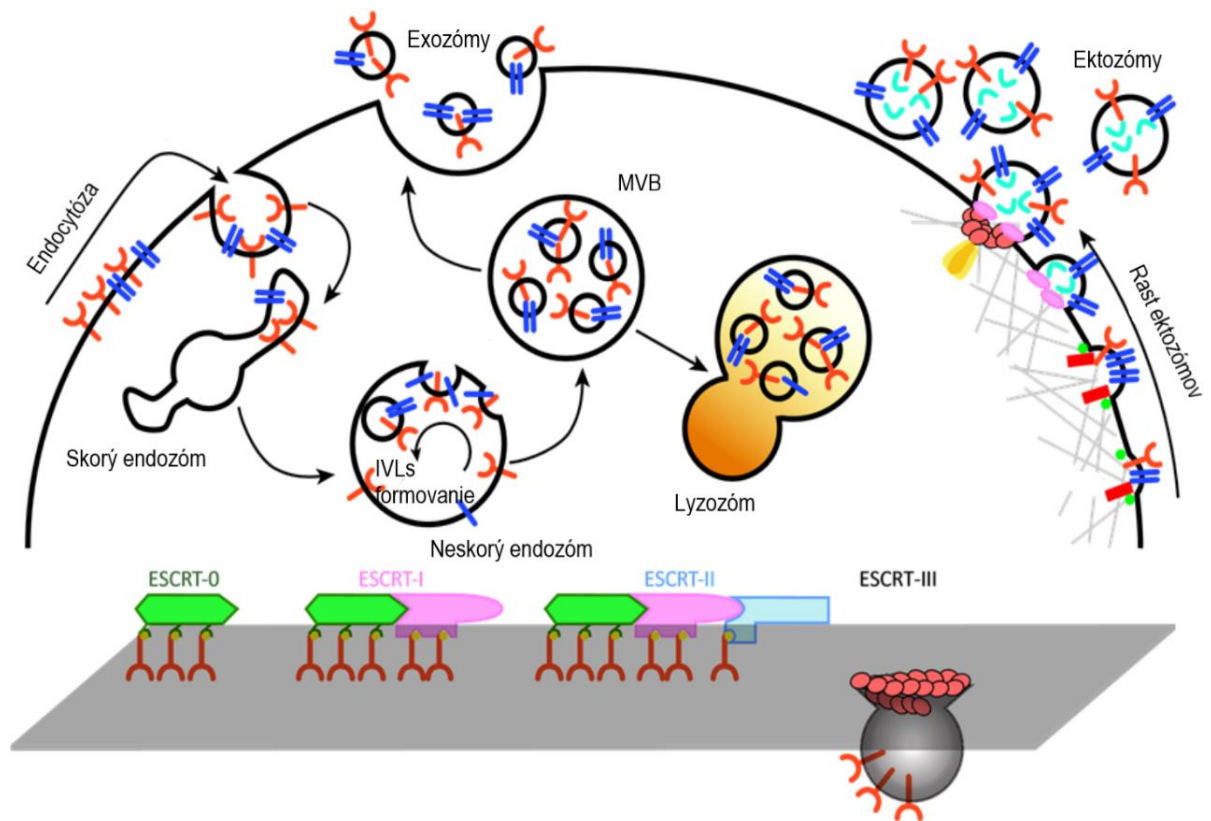
2.2 Biogenéza exozómov

Vznik exozómov (vid' *Obrázok 4*) je generovaný endozomálnou cestou, vedúcou najprv k tvorbe MVBs, patriace medzi endozomálne organely charakterizované mnohonásobnými intraluminálnymi vezikulami (Intraluminal Vesicles, ILVs) ohraničené vonkajšou membránou [45; 56]. Endocytárne dráhy sú spojené so skorými endozómami, ktoré sa vyznačujú prítomnosťou malej GTPázy z rodiny Rab, Rab5. Skorý endozóm sa označuje aj ako triediaci endozóm, pretože proteíny môžu byť recyklované do plazmatickej membrány, privedené trans-Golgiho sieťou alebo označené pre degradáciu v lyzozómálnej dráhe. Lyzozomálne triedenie zahŕňa prenos proteínov do neskorých endozómov, ktoré sú rovnocenné s MVBs. Neskoré endozómy sa vyznačujú ďalšou malou GTPázou rodiny Rab, Rab7 [57; 58]. Iniciačným krokom v tvorbe exozómov je teda vytvorenie ILVs vnútorným vypučaním membrány MVBs vplyvom fyzikálnych ale aj chemických podnetov [45; 56]. Tieto MVBs tak obsahujú okolo 40 – 100 nm veľké ILVs, ktoré sa postupne hromadia počas dozrievania neskorých endozómov. Sú to vlastne prelyzozomálne štruktúry patriace do degradujúcej endozomálnej dráhy. Tvorba ILVs počas konverzie neskorých endozómov na MVBs spočíva aj v akumulácii rôznych lipidov vrátane cholesterolu, sfingomyelínov, a najmä ceramidu, ktorý hrá dôležitú úlohu pri tvorbe týchto vezikúl. Exozómy napriek tomu že pochádzajú z rozličných typov buniek nadobúdajú pri svojej syntéze určitý spoločný súbor molekúl nevyhnutný pre vznik ich štruktúry ako aj transport [5; 22; 32]. Formovanie skorých endozómov a MVBs sa zvyšuje pri signalizácii prostredníctvom receptorov rastového faktora, čo naznačuje, že bunka upravuje produkciu exozómov podľa svojej potreby. Generácia MBVs taktiež sprostredkováva tvorbu a sekréciu exozómov [23]. Kritickým aspektom procesu je akumulácia a spracovanie ubikvitinovaných proteínov, ktoré sa prostredníctvom cytosolického endozomálneho triediaceho komplexu (Endosomal Sorting Complex Required for Transport, ESCRT) prenášajú z plazmatickej membrány a endozómov do IVLs [31].

2.2.1 Význam cytosolického endozomálneho triediaceho komplexu

Vzhľadom na rozmanitosť exozomálnych proteínov: transmembránových, periférne asociovaných membránových proteínov, cytosolických proteínov a chaperónov sa predpokladá, že ich transport na endozomálnej úrovni do ILVs zahŕňa niekoľko účastníkov, akými sú napríklad komponenty systému ESCRT, lipidy a / alebo tetraspanínmi obohatené mikrodomény [59]. Na tvorbe a sekrécii exozómov sa podieľa množstvo molekúl, ako aj už v predchádzajúcej kapitole spomínaný ESCRT komplex [31]. ESCRT je zahrnutý v biogenézi MBVs ako aj IVLs. Tento komplex pozostáva z multipodjednotkového mechanizmu, tvoreného približne dvadsiatimi proteínmi. Tie sú zoskupené do systému štyroch samostatných proteínových komplexov ESCRT-0, -I, -II, -III [13; 60; 61]. Každý z týchto komplexov zohráva inú úlohu od interakcie s ubikvitinovanými membránovými proteínmi až po deformáciu, naštiepenie membrány a jej oddelenie. [62]. Dva typické exozomálne proteíny sú Tsg101, ktorý patrí do proteínového komplexu ESCRT-I a ALG-2 interagujúci proteín-X (ALG-2 interacting protein-X, Alix), ktorý je asociovaný s komplexom ESCRT-III [38; 45; 63]. Komplex ESCRT-0, pozostávajúci z tyrozínkinázového substrátu regulovaného hepatocytovým rastovým faktorom (Hepatocyte Growth Factor-Regulated Tyrosine Kinase Substrate, Hrs) a adaptórovou molekulou prenášajúcou signál (Signaltransducing Adaptor Molecule, STAM) [64].

ESCRT mechanizmus je iniciovaný rozpoznávaním a vychytávaním ubikvitinovaných proteínov podľa špecifických domén endozomálnej membrány pomocou Hrs ubikvitin viazaných podjednotiek komplexu ESCRT-0. Hrs takto aktivuje Tsg101 proteín asociovaný s komplexom ESCRT I, ktorý je taktiež schopný rozoznať ubikvitínové skupiny. ESCRT I následne stimuluje ESCRT III prostredníctvom ESCRT II. Nakoniec disociácia a recyklácia ESCRT mechanizmu vyžaduje interakciu s Vps4, kvôli dodaniu potrebnej energie [59]. Po interakcii komplexov ESCRT-I a II dôjde k spolupráci s posledným komplexom ESCRT-III a následne sa celý aktivovaný systém zapojí do procesov tvorby exozómov. Nakoniec dochádza k naštiepeniu väzieb na príslušnú formu IVLs. Komplex ESCRT-III riadi štiepenie a separuje tieto IVLs z membrány MVBs pomocou AAA-ATPázy Vps4, ktorý dodal potrebnú energiu [1; 13; 39; 61]. Napriek kontroverzii, či je uvoľňovanie exozómov naozaj regulované mechanizmom ESCRT, boli už v exozómoch izolovaných z rôznych typov buniek identifikované niektoré komponenty ESCRT komplexov spolu s ubikvitínovanými proteínmi [39].



2.2.2 Obrázok 4: Biogenézia exozómov za účinnosti mechanizmu ESCRT. Prevzaté a modifikované z [31]Biogenézia nezávislá na ESCRT mechanizme

Niektoré štúdie naznačujú, že biogenéza MVBs sa môže vyskytnúť bez ESCRT. Napríklad sa ukázalo, že napriek simultánnemu umlčovaniu kľúčových podjednotiek všetkých štyroch komplexov ESCRT sa ILVs stále tvoria v MVBs, čo naznačuje prítomnosť mechanizmov nezávislých od ESCRT [65]. Na základe pozorovaní oligodendroglálnych bunkových línií, ktoré secernujú proteolipidový proteín v spojení s exozómami, bolo zistené, že nevyžadujú pre biogenézu a sekréciu exozómov mechanizmus ESCRT. Ale sú závislé od sfingomyelinázy, enzýmu, ktorý produkuje ceramid. Tieto pozorovania sú v súlade s prítomnosťou vysokých koncentrácií ceramidu a jeho derivátov v exozómoch [41]. Tetraspaníny, transmembránové proteíny bohato obsiahnuté v exozómoch, sú taktiež zapojené do ich uvoľňovania nezávisle od komplexu ESCRT. Počas štúdie Arthit Chairoungdua a kol., sa ukázalo že expresia tetraspanínov CD9 a CD82 zvyšuje exozomálne uvoľňovanie β -katenínu z nádorovej línie buniek HEK293 [66]. V tej istej štúdií autori tiež zistili, že CD9 dendritických buniek kostnej drene z myši vylučujú v menšej miere fotillín-1 asociovaný s exozómami. Ďalším tetraspanínom, o ktorom sa ukázalo, že je zapojený do biogenézy exozómov, je Tspan8. Jeho expresia v bunkách adenokarcinómu potkana neovplyvnila síce celkové množstvo sekretovaných exozómov, ale skôr pozmenila mRNA a proteínové zloženie exozómov [67].

Existencia mechanizmov pre tvorbu MVBs nezávislých od ESCRT je podporená zistením, že bunky súčasne ochudobnené o štyri podjednotky komplexu ESCRT sú stále schopné vytvárať CD63-pozitívne MVBs, keďže sa zistilo že tetraspanín CD63 tiež zohráva úlohu pri tvorbe exozómov [1; 15; 65].

2.3 Sekrécia exozómov

Bunky cicavcov vylučujú proteíny exocytárnou dráhou na základe fyziologických stimulov, pri ktorých dochádza k uvoľňovaniu sekrečných alebo zásobných granúl. Ďalšou možnosťou pre transport proteínov je endocytárna dráha, ako je tomu aj v prípade exozómov [59]. Exozómy uvoľňované z buniek môžu pôsobiť parakrinne alebo dokonca endokrinne, aby modifikovali správanie susedných buniek alebo vzdialených buniek. K prenosu signálov do buniek dochádza priamym kontaktom medzi exozómom a bunkovou membránou, buď prostredníctvom receptorov bunkového povrchu, fúziou týchto dvoch membrán alebo endocytózou. Kombinácia špecifických molekúl bunkového povrchu na exozómoch je kritická pre ciele označenie a adhéziu buniek [36]. Exozómy sú tak uvoľňované priebežne alebo po aktivácii bunkovej sekrécie u života schopných buniek. No v žiadnom prípade nie sú sekretované z lyzovaných buniek či apoptotických teliesok. Je známe že väčšina buniek ako sú retikulocyty, DC, B- a T-bunky, trombocyty, epiteliálne bunky, neuróny, oligodendrocyty, schwanove a tumorové bunky sú schopné uvoľňovať exozómy [38; 58].

Avšak prevažná väčšina exozómov v cirkulácii pochádza z krvných doštičiek. Za normálnych okolností 80 % týchto vezikúl pochádza z doštičiek, 10 % z endotelií a 10 % sú sekretované z leukocytárných buniek [58]. Na rozdiel od iných EVs nie sú exozómy uvoľňované odštiepením plazmatickej membrány ale vylučujú sa z vnútrobunkového kompartmentu spojeného s neskorým endozómom. Neskoré endozómy obsahujú množstvo už spomínaných MVBs pohybujúcich sa pozdĺž mikrotubulov aby sa tak mohli spojiť s plazmatickou membránou a následne dochádza k sekrécii IVLs do extracelulárneho priestoru. Tieto IVLs sa tak následne nazývajú exozómy [32; 45]. Okrem toho sú do tejto dráhy zapojené Rab guanozíntrifosfatázy (GTPázy), G-proteíny, proteínkináza D, glykosfingolipidy a flotillín [13].

2.3.1 Regulačné mechanizmy sekrécie exozómov

Ako už bolo spomenuté v predchádzajúcej kapitole, k sekrécii exozómov dochádza fúziou MVBs a bunkovej membrány. Takáto fúzia závisí od niekoľkých proteínov Rab GTPázy [36]. Ukázalo sa, že niekoľko Rab GTPáz pôsobia ako kľúčové regulátory exozomálnej sekrečnej

dráhy. Rab proteíny sú veľkou skupinou malých GTPáz regulujúcich transport proteínov prostredníctvom endocytárnych a exocytárnych dráh vo všetkých typoch buniek. Okrem toho sú tieto proteíny Rab zapojené do membránového „obchodovania“ t.j. pučania stien vezikúl, fúzie membrán a transportu vezikúl pozdĺž aktínu a tubulínu. Rab GTPázy sú zložené z približne 70 rôznych proteínov. Bežné zahŕňajú Rab11, Rab27 a Rab35. Všetky tieto proteíny sa totiž podieľajú na transporte endolyzomálnych vezikúl smerom k plazmatickej membráne [13]. GTPázy Rab11, Rab27a a Rab27b kontrolujú sekrečné dráhy vrátane uvoľňovania exozómov, pravdepodobne reguláciou transportu MVBs k plazmatickej membráne, priľnutím vezikúl k plazmatickej membráne a pomáhajú tak ich fúzii s ňou [12; 37; 68]. Komplex rozpustného N-etylmaleínimidového senzitívneho faktorového väzbového proteínového receptora (SNARE) riadi membránovú fúziu, a teda sekreciu exozómov. Proces fúzie začína interakciou membránového proteínu synaptotagmínu pôsobiaceho ako kalciový senzor lokalizovaný na MVBs a proteínu plazmatickej membrány, syntaxínu. Následne akumulované MVBs sa spoja s plazmatickou membránou cez trans-SNARE komplex pozostávajúci z v-SNARE a t-SNARE proteínov ukotvených na MVBs a plazmatickej membráne, čo vedie k uvoľňovaniu exozómov do mimobunkového prostredia [69; 70].

2.4 Funkcia exozómov

Exozómy sa podieľajú na rôznych funkciách, ako je napríklad eradikácia zastaraných molekúl; prezentácia antigénu, progresia nádoru podporou angiogenézy a migrácie nádorových buniek počas metastáz, diferenciácia regulačných T lymfocytov alebo myeloidných buniek na potlačenie imunitných reakcií a šírenie patogenézy prostredníctvom interakcie s recipientnými bunkami. Funkcie EVs závisia od ich schopnosti interakcie s recipientnými bunkami a dodávania ich obsahu proteínov, lipidov a RNA do týchto buniek. Špecifickosť väzby na cieľové bunky je riadená adhéznymi molekulami, ako sú napríklad integríny. Podobne sa exozomálne tetraspanínové komplexy tiež podieľajú na selekcii cieľových buniek in vitro a in vivo, pravdepodobne moduláciou integrínov [17].

2.4.1 Exozómy a imunitný systém

Normálne fyziologické funkcie exozómov zostávajú zväčša nepreskúmané. Doteraz jediné poznatky o ich úlohe v zdravom prostredí zahŕňajú normálnu synaptickú fyziológiu a moduláciu imunitnej reakcie v dôsledku ich schopnosti prezentácie antigénu a aktivácie T- buniek, keď sú odvodené od kompetentných antigén prezentujúcich buniek (APC), ako sú

napríklad DC. Exozómy hrajú signálnu úlohu v imunitnom systéme, pričom nezrelé DC prenášajú molekuly MHC prostredníctvom exozómov do iných DC, aby tak vyvolali imunitnú odpoveď [36; 71]. Exozómy tak môžu stimulovať DC, aby produkovali cytokíny IFN- γ , TNF- α , aby spôsobili zápalovú odpoveď, a tiež môžu zvýšiť expresiu molekúl bunkového povrchu v DC, ako sú MHC-I alebo MHC-II, ktoré by mohli aktivovať výsledné T lymfocyty pri ďalšej imunizácii buniek [44]. Biologický význam exozómov bol však podrobnejšie skúmaný v oblasti rakoviny [36].

2.4.2 Úloha exozómov v karcinogézi

Každý krok exozómálnej biogenézy vrátane ich transportu k plazmatickej membráne, fúzii a uvoľňovaniu je vysoko organizovaný a regulovaný proces. Pri nádorových zmenách sa tento funkčný systém potenciálne mení [12]. Zdá sa, že zložitá komunikačná sieť sprostredkovaná exozómami, vytvorená medzi nádorovými a nenádorovými bunkami je zapojená do každého kroku progresie rakoviny, od rastu nádoru až po šírenie buniek [71]. Exozómy slúžia ako účinný komunikačný systém medzi nádorom a hostiteľskými bunkami [72]. Úloha imunitného systému pri vývoji a progresii rakoviny je už dávno objasnená [73]. Ľudské nádory však využívajú rôzne mechanizmy na to, aby sa vyhli imunitnému systému a chránili sa pred tumor indukovanou imunosupresiou [74].

Rakovinové bunky vyvinuli exozómami sprostredkované mechanizmy na podporu priaznivého nádorového mikroprostredia (Tumor Microenvironment, TM), ktoré podporuje rast nádoru prostredníctvom zvýšenej proliferácie buniek a úniku do apoptózy. Proliferatívne rakovinové bunky vykazujú: (a) zväčšenie rakovinového tkaniva s angiogéznou, (b) získanie migračnej a invazívnej funkcie, (c) nadobudnutie schopnosti zabráneniu napadnutia imunitnými bunkami, (d) tvorbu metastatických lézií. Na základe doterajších štúdií sa ukázalo, že exozómy sa podieľajú na každom z týchto procesov. Ako už bolo povedané, exozómy odvodené od nádorových buniek majú schopnosť indukovať angiogézu. To umožňuje TM prístup k živinám, kyslíku a odstraňovaniu odpadu a prispieva tak k metabolickému preprogramovaniu rakovinových buniek poskytovaním prostriedkov na ich trvalú proliferáciu [55]. Schopnosť nádorov stať sa invazívnymi a šíriť sa vysoko podporujú tieto rakovinové exozómy, ktoré nesú informácie, prispievajúce k remodelácii extracelulárnej matrix (Extracellular Matrix, ECM), migrácii rakovinových buniek a invázii. A nakoniec, rakovinové exozómy zohrávajú kľúčovú úlohu pri úniku nádoru z imunitného dohľadu [71]. Spomedzi širokého spektra mechanizmov prispievajúcich k imunosupresii v TM, novšie štúdie identifikovali exozómy odvodené z nádoru ako nosiče imunosupresívnych proteínov, ktoré po dodaní recipientným imunitným

bunkám preprogramujú jej funkcie, čo následne vyvolá potlačenie protinádorovej aktivity. Exozómy tiež sú schopné preprogramovať neimunitné bunky v TM, premieňajú ich na výrobcov faktorov, podporujúce rast nádoru na jednej strane a potláčajú funkcie imunitných buniek na strane druhej [17; 72]. Imunitné bunky v TM vylučujú chemokíny, cytokíny, rastové faktory a proteolytické enzýmy, ktoré môžu povzbudiť progresiu nádoru, modulovať imunitné úniky alebo aktívne usmrtiť nádorové bunky. Ďalej je nábor a migrácia imunitných buniek do TM riadená dynamickou signalizáciou a exozómy sú kľúčovou súčasťou týchto interakcií. Exozómy z rakovinových buniek môžu priamo aktivovať prirodzene zabíjačské bunky (Natural Killers, NK), makrofágy, B a T bunky [75; 76; 77]. Reakcia NK buniek a T buniek na patogény a nádory je regulovaná integráciou signálov z mnohých receptorov exprimovaných na ich bunkovom povrchu, ktoré môžu iniciovať, zosilniť alebo potlačiť ich efektorové funkcie. Zatiaľ čo pri rozpoznávaní a aktivácii T-buniek dominujú antigén-špecifické receptory T-buniek (TCR), NK bunky používajú rozsiahly repertoár receptorov, z ktorých mnohé sú tiež exprimované T bunkami. Jedným z najlepšie charakterizovaných receptorov zdieľaných NK a T bunkami je NKG2D [78].

Rakovinové bunky produkujú veľké množstvo exozómov nesúcich proapoptotické molekuly, ako je Fas ligand (FasL) a TRAIL, schopné indukovať apoptózu v aktivovaných T bunkách, a tým blokovat' imunitnú odpoveď. V roku 2005 Huber a kol. uviedli, že FasL exprimovaný na povrchu exozómov odvodených z buniek rakoviny hrubého čreva spôsobil apoptózu T buniek [79]. Okrem toho v roku 2006 Liu a kol. publikovali, že exozómy pochádzajúce z buniek rakoviny prsníka prispievajú k rastu nádoru blokovaním proliferácie a aktivácie NK buniek sprostredkovanou IL-2 [80]. Podobne Clayton a kol. publikovali, že exozómy pochádzajúce z rakovinových buniek potláčajú expresiu NKG2D, ktorá je potrebná na aktiváciu NK buniek [81]. De Vrij a kol. v roku 2015 uviedli, že exozómy získané z gliómu indukovali diferenciáciu monocytov na imunosupresívne makrofágy [82]. Exozómy pochádzajúce z rakovinových buniek indukujú smrť imunitných buniek alebo inhibujú ich aktiváciu alebo diferenciáciu in vivo, aby tak zohrávali dôležitú úlohu pri napomáhaní rakovinovým bunkám vyhnúť sa útokom takýchto buniek [55].

Exozómy vylučované rakovinovými bunkami tiež obsahujú molekuly, ktoré umožňujú nádorom rásť a aktívne tvoriť metastázy: transmembránové proteíny ADAM10, ADAM17, kadherín-11 [83]. Migrácia a invázia rakovinových buniek je v tomto procese dôležitá a považuje sa za prvý krok k šíreniu nádorov do okolia. Pri invazívnom procese je dôležitá expresia a aktivácia faktorov degradujúcich proteíny. V roku 2010 McCready a kol. uviedli, že HSP90 α existuje na povrchu exozómov získaných z rakovinových buniek s vysokou

invazívnou kapacitou, ktorý pôsobí autokrinne a aktivuje plazminogén na zvýšenie invazívnej kapacity rakovinových buniek [55; 84].

3 Využitie exozómov v diagnostike nádorových ochorení

Pretože exozómy sa uvoľňujú na vysokej úrovni počas progresie rakoviny, množstvo exozómov zistené u pacientov s rakovinou je oveľa vyššie ako množstvo od zdravých jedincov [43]. Väčšina cirkulujúcich exozómov sa uvoľňuje doštičkami, lymfocytmi, DC a ďalšími imunitnými bunkami. Odhaduje sa, že exozómy uvoľňované týmito bunkami tvoria 80 – 90 % exozómov v sére / plazme. Okrem toho veľká časť cirkulujúcich exozómov sa uvoľňuje endoteliálnymi bunkami a v krvi pacientov s rakovinou malígnymi bunkami - exozómy odvodené od nádorov (Tumor-Derived Exosomes, TEXs). Jednotlivé populácie exozómov sa dajú rozlíšiť na základe ich možných povrchových antigénov. Preto identifikácia a izolácia TEXs cirkulujúcich v krvi, ktoré sú veľmi zaujímavými diagnostickými cieľmi, predstavuje náročnú výzvu vyžadujúcu znalosť špecifických nádorových markerov [85; 86]. Schopnosť detegovať a izolovať TEXs teda môže výskumníkom umožniť skúmanie intracelulárnych signálov medzi bunkami a analýzu funkčných molekulárnych komponentov (proteíny, mRNA a mikroRNA), čím sa poskytnú zásadné informácie o diagnóze a prognóze rakoviny [43].

3.1 Metódy izolácie a detekcie exozómov

Periférna krv je vo všeobecnosti ľahko prístupným materiálom pre diagnostiku pomocou čoho možno získať dôležité klinické informácie o štádiu ochorenia a odpovedi na liečbu. Síce sérum aj plazma obsahujú exozómy, no je však dôležité si uvedomiť, že súčasne tieto vzorky obsahujú aj cirkulujúce bunky a subcelulárne štruktúry, ako sú zvyšky buniek a ďalšie triedy EVs. Preto obsah týchto cirkulujúcich štruktúr spolu s „rozpuštnými“ zložkami krvi (napr. lipoproteíny a bohato zastúpené – abundantné sérové proteíny) by mal byť považovaný za „kontamináciu“ v pozadí štúdií zameraných na exozómy [85]. Konvenčné metódy izolácií exozómov sú založené na ich fyzikálnych vlastnostiach, ako je veľkosť a hustota, ktoré zahŕňajú ultracentrifugáciu (Ultracentrifugation, UC), centrifugáciu s hustotným gradientom, ultrafiltráciu (Ultrafiltration, UF), gélovú permeačnú chromatografiu (Size Exclusion Chromatography, SEC). Ďalej založené na ich rozdielnej rozpustnosti (chemické zrážanie, imunoprecipitácia), či na základe ich molekulového zloženia (imunoafinitné metódy, IA) akou je napr. enzýmová imunoanalýza na pevnej fáze (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA) [22; 43; 87; 88].

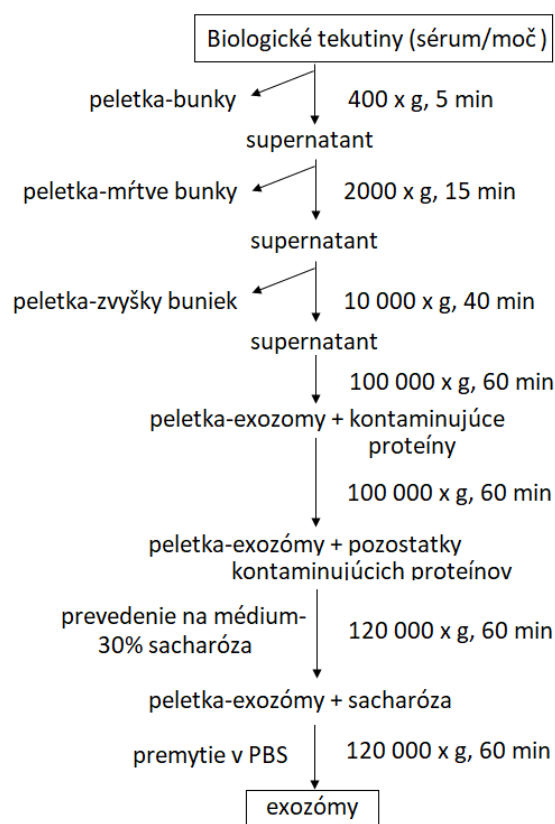
3.1.1 Ultracentrifugácia

Pre izoláciu exozómov sa UC metóda považuje za zlatý štandard izolácie exozómov [43; 89; 90]. Princíp tejto metódy spočíva v oddelení exozómov od ostatných zložiek prítomných vo vzorke na základe ich objemu a fyzikálnych vlastností, ako je hustota pohybujúca sa v rozmedzí 1,10 – 1,18 g / ml [33]. V prípade všetkých spôsobov odstreďovania oddelenie exozómov a ďalších EVs od extracelulárnej matrice závisí teda od hustoty, veľkosti a tvaru, pričom väčšie častice o vyššej hustote sedimentujú ako prvé.

Samotná UC so sebou nesie riziko kontaminácie inými vezikulami vrátane agregátov a lipoproteínov, ktoré sa tiež usadzujú (peletujú) vysokorýchlostným odstredením. Preto sa používa centrifugácia s gradientom hustoty ako pokračovanie UC, čím sa umožňuje lepšie oddelenie častíc, keď je potrebná ich mimoriadna čistota [91]. Centrifugácia v hustotnom gradiente je založená na UC vzoriek spolu s netoxickým médiom s gradientom hustoty napr. sacharózy alebo jodoxinolu na ďalšiu purifikáciu exozómov. Po centrifugácii pri 100 000 x g počas 16 hodín sa exozómy obohatia v oblasti hustoty medzi 1,10 až 1,18 g / ml, zatiaľ čo proteínové agregáty sa lokalizujú na dne centrifugačnej skúmavky [33]. Paolini a kol. izolovali exozómy zo séra pacientov rôznymi populárnymi metódami, v ktorých bola zahrnutá centrifugácia v hustotnom gradiente. Produkty získané odstredením v lineárnom gradiente sacharózy (2,0 – 0,25 M) boli čistejšie ako pri diferenciálnej centrifugácii či jednokrokových zrážacích súpravách [92]. Webber a kol. preukázali vo svojej štúdií, že pomocou UC metódy s gradientom sacharózy, schému postupu možno vidieť z *Obrázka 5*, čím získali vysoko čistú exozomálnu frakciu. Toto však platilo iba pre exozómy purifikované z kultivačného média buniek, pretože exozómy z moču a séra pomocou tejto techniky mali nízku čistotu. Autori a ďalší uznali, že táto metóda nie je vhodná na analýzy potrebné pre klinické štúdie biomarkerov [93; 94]. Napriek širokému používaniu má UC s gradientom hustoty sacharózy niekoľko nevýhod. Dokončenie viacerých odstreďovaní vyžaduje priveľa času, taktiež relatívne veľký objem vzoriek. A nakoniec, vysokorýchlostná UC zvyšuje riziko prasknutia a straty vezikúl [9].

Ľudské telesné tekutiny však predstavujú komplexné zmesi mnohých zložiek vrátane vezikúl rôznych veľkostí, proteínových komplexov, agregátov proteín-nukleovej kyseliny a subcelulárnych fragmentov. Keďže sú pri vysokých rýchlostiach 100 000 g generované proteínové agregáty, vezikuly sa môžu zhlukovať. Izolácii vezikúl z plazmy ďalej bráni viskozita, hustota plazmy a prítomnosť lipoproteínových častíc s hustotou a priemerom podobným ako EVs. V dôsledku toho izolácia vezikúl z plazmy alebo séra UC s hustotným

gradientom vedie aj k spoločnej izolácii lipoproteínov s vysokou hustotou [95]. Izolácia dobre definovaných exozomálnych frakcií bez „kontaminujúcich“ vezikulárnych a nevezikulárnych zložiek z ľudskej plazmy a séra, ktoré obsahujú veľmi vysoké koncentrácie albumínu a imunoglobulínu G je pomerne náročná [90; 96]. Tendencia exozómov vytvárať agregáty rôznych veľkostí vedie k stratám, čo ďalej komplikuje ich výťažnosť [97]. Uskutočnilo sa len niekoľko pokusov o optimalizáciu izolácie exozómov z ľudskej plazmy ako napríklad Théry a kol z roku 2006, Witwer a kol. v roku 2013, či Lobb a kol v roku 2014 [98; 99; 100]. Avšak exozómy izolované UC môžu byť vhodné pre analýzy, ak kontaminujúce artefakty nezasahujú do ďalších meraní [96].



Obrázok 5: Schéma diferenciálnej UC pre izoláciu exozómov zo séra a moču. Prevzaté a modifikované z [93]

3.1.2 Ultrafiltrácia

Izolácia v podobe UF má podobné základy ako konvenčná metóda filtrácie založená na veľkosti alebo molekulovej hmotnosti. Ultrafiltračná membrána využíva rôzne veľkosti nanomembrán alebo medznú hodnotu cut-off molekulovej hmotnosti (MWCO) na zachytenie exozómov v supernatantoch bunkovej kultúry alebo v telových tekutinách. MWCO sa týka najmä relatívnej molekulovej hmotnosti najväčšej molekuly, ktorá môže voľne prechádzať

cez porézny materiál. Napríklad Cheruvanky a kol. preukázali, že s UF možno obohatiť exozómy z objemu 0,5 ml moču s vyššou účinnosťou, ako pri UC [17; 101]. Lai a kol. vo svojej práci využívali MWCO membrány od 100 do 1000 kDa na izoláciu exozómov zo supernatantu kultúry ľudských mezenchýálnych kmeňových buniek [102].

Kroky pri UF sa môžu použiť na získanie vysoko čistých EVs v porovnaní s inými metódami. Tento spôsob izolácie exozómov využíva nanomembránové koncentrátoory vybavené semipermeabilnými polyétersulfónovými membránami [103]. Príkladom súpravy pre túto aplikáciu je Vivaspín 20, 100 kDa MWCO, ktorý sa použil na izoláciu exozómov z moču v štúdiu Alvarez a kol. [88]. Nevýhody UF zahŕňajú ťažkosti pri odstraňovaní zvyškov proteínov, ktoré prilnú k nanomembráne, a elúcii exozómov z membrány. Pred niekoľkými rokmi bol vyvinutý ExoMir, komerčná izolačná súprava exozómov. Táto súprava sa skladá z dvoch mikrofiltrov s veľkosťou pórov 20 a 200 nm. Väčšie extracelulárne vezikuly sú obohatené na hornej membráne, zatiaľ čo všetky vezikuly s priemerom medzi 20 a 200 nm sa zachytávajú na druhom mikrofiltri [33].

Čo sa týka modernizácie a technického pokroku, Liu a kol. vynášali a prezentovali nástroj pre izoláciu EVs. Celkový exozómový izolačný čip (Exosomal Total Isolation Chip, ExoTIC), ktorý poskytuje vysoko výnosné EVs pre následnú analýzu. ExoTIC dokáže účinne izolovať neporušené EVs z kultivačného média ako aj z ľudskej plazmy. ExoTIC umožňuje triedenie EVs podľa veľkosti od heterogénnych populácií. ExoTIC bol špeciálne navrhnutý na zjednodušenie izolácie EVs vo výskume a v klinickej praxi. ExoTIC používa jednoduchý filtračný prístup, pri ktorom klinické vzorky obsahujúce EVs vrátane kultivačného média, plazmy a moču, prechádzajú cez nanoporéznu membránu, aby obohatili a vyčistili neporušené EVs v rozsahu veľkosti 30 – 200 nm. Voľné nukleové kyseliny, proteíny, lipidy a ďalšie malé fragmenty sa prepláchnu a koncentrované EVs sa zbierajú z filtračnej membrány. ExoTIC dosahuje výťažok EVs ~ 4 až 1 000-krát vyšší ako pri UC. Schopnosť ExoTIC účinne izolovať EVs z malých objemov vzoriek 10 – 100 µl otvára možnosti na preklinické štúdie na modeloch s malými nádormi zvierat a na klinické testovanie [104].

3.1.3 Gélová permeačná chromatografia

Inou metódou izolácie exozómov, ktorá ťaží z rozdielov vo veľkosti medzi izolovanými zložkami, je SEC. Separácia požadovaných častíc sa uskutočňuje pomocou kolón naplnených heterogénnymi polymérnymi guľôčkami [85; 105; 106]. V tomto prípade sa najbežnejšie používa gélové filtračné médium sefaryzy (CL-2B, CL-4B) obsahujúce zosieťovanú formu

gul'ôčok agarózy s rôznymi priemerami [107; 108; 109]. SEC sa bežne používa na izoláciu EVs z biologických vzoriek, ako je sérum / plazma a sliny zvyčajne k dispozícii iba v malých objemoch vzoriek (od 0,5 µl do 2 ml), stále dostatočných na následné analýzy [110]. Pri izolácii sa vzorka nanesie na náplňovú kolónu a nechá sa prejsť heteroporéznou maticou. Medzi komponentmi matrice a vzorkou by nemala existovať žiadna interakcia. Väčšie molekuly môžu skôr vstúpiť do menšieho množstva pórov ako menšie molekuly, ktoré sú prv eluované z média. Čím sú častice menšie, tým sa predlžuje ich retenčný čas a na základe toho sú neskôr eluované z kolóny [105]. Hlavnými výhodami tohto spôsobu sú jeho dobrá reprodukovateľnosť a vysoká účinnosť pri odstraňovaní interferujúcich kontaminantov. Nízky tlak alebo ešte častejšie používaný tok závislý od gravitácie navyše umožňuje získať nepoškodené vezikuly pravidelného tvaru [107].

Vlastné kolóny sa môžu prispôbiť konkrétnym experimentálnym podmienkam, no objem vzorky by však nemal prekročiť 10 % objemu matrice, čo robí túto metódu z dôvodu nákladov menej užitočnou pre väčšie objemy vzoriek [105]. Je pravdepodobné, že toto obmedzenie SEC je hlavnou príčinou jej nízkej popularity pre samostatnú izoláciu vezikúl, ktorá bola úspešne prezentovaná aj v štúdiách Böing a kol. či de Menezes-Neto a kol. pre exozómy pochádzajúce zo séra a plazmy vo vzťahu k analýze s hmotnostnou spektrometriou [95; 111]. V roku 2014 Böing a kol. preukázali, že pomocou 10 ml kolón naplnených sefarózou CL-2B sa efektívne izolujú EVs z plazmy. Snímka kolóny je zobrazená spolu s elúciami EVs na *Obrázku 6* [95]. No tieto kolóny sú však vhodné iba pre malé objemy vzoriek približne 0,5 ml. Pretože médiá bunkových kultúr sú pomerne zriedené čo sa týka EVs, no na ich izoláciu sa vyžadujú veľké objemy až okolo 100 ml [108]. Z tohto dôvodu sa používa UF, ako prvý krok ešte pred SEC, kde sa molekuly vody a menšie proteíny pretlačia cez poréznu membránu s MWCO do 100 kDa, ako uviedli v štúdiách Baranyai a kol. či Guerreiro a kol. [96; 110]. To zachováva EVs a väčšie proteíny v zníženom objeme, ktorý sa potom môže naniest' na SEC kolónu. Takto sa dosiahne efektívnejší výťažok zo vzoriek akými sú bunkové kultúry [110].



Obrázok 6: Kolóna naplnená sefarózou CL-2B pre izoláciu EVs z ľudskej plazmy [95]

3.1.4 Precipitačné techniky

Na vyzrážanie či precipitáciu, vírusov a iných malých častíc sa bežne používajú hydrofilné polyméry. Polymér použitý na izoláciu exozómov musí byť vyrobený z neškodných a inertných materiálov, ktoré nevyvolávajú imunitné reakcie *in vitro* alebo *in vivo*, ako napríklad polyethylénglykol (PEG) [33; 112; 113]. PEG zapríčiňuje zmenu rozpustnosti exozómov, čím uľahčuje ich precipitáciu z biologických tekutín. Tento spôsob umožňuje separáciu exozómov od proteínov, ale nie od iných EVs, proteínových agregátov alebo lipidových častíc. Rider a kol. navrhli prístup izolácie exozómov založený na zrážaní PEG [17; 114]. Inkubáciou kultivačného média s PEG a centrifugáciou počas kratšej doby ako pri metóde diferenciálnej centrifugácie, ktorá je zlatým štandardom, je možné tak získať exozómy s relatívne vysokou čistotou a mierou výťažnosti. Táto technika, nazývaná ExtraPEG, rýchlo a lacno obohacuje exozómy z veľkých objemov média pomocou nízkorýchlostného odstredovania, po ktorom nasleduje jediný malý stupeň čistenia ultracentrifugáciou. Metóda ExtraPEG sa môže ľahko prispôbiť tak, aby obohatila rôzne populácie vezikul, alebo ako účinný prekursor následných purifikačných techník, čím poskytuje prostriedok na zber exozómov z mnohých rôznych biologických tekutín a na rôzne účely [115]. Weng a kol. okrem toho potvrdili optimálne podmienky obohatenia

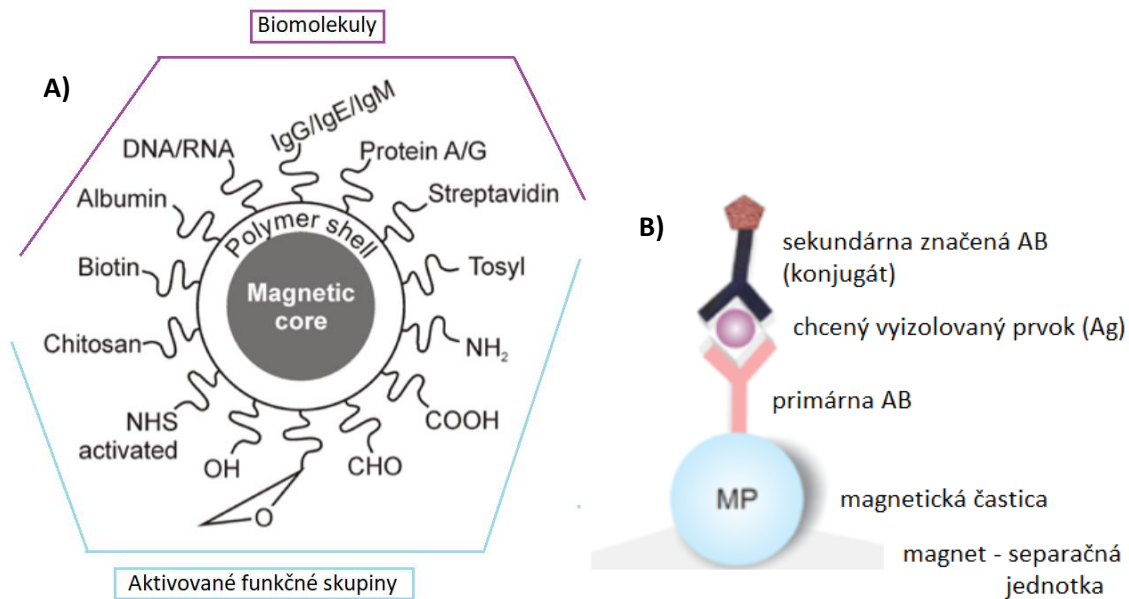
exozómov optimalizáciou relatívnej molekulovej hmotnosti, obsahu a koncentrácie (0,08 g / ml) soli PEG [116].

V poslednej dobe sa stali populárnymi, ale nákladnými komerčné testy fungujúce na princípe polymerizačnej precipitácie, ako je ExoQuick™ a Total Exosome Isolation™. Napriek rozsiahlemu použitiu týchto činidiel sa uvádza len veľmi málo informácií o kvalite a množstve zozbieraných exozómov v porovnaní s inými metódami [112; 115; 117]. Andreu a kol. použili oba tieto komerčné testy pre izoláciu exozómov z ľudského séra pre následnú detekciu exozomálnej miRNA [118].

3.1.5 Imunoafinitné metódy

Na rozdiel od techník založených na precipitácii imunoafinitné metódy (Imuno-Affinity, IA) poskytujú presnejšie zachytenie špecifických exozómov, s mnohonásobne zvýšenou účinnosťou pri výťažku vysoko čistých a neporušených exozómov z komplexných vzoriek, pričom sa znižujú kapitálové náklady a čas potrebný na výkon v porovnaní s technikami UC alebo UF. Okrem umožnenia výberu špecifických exozomálnych subpopulácií sa IA môže ľahko spojiť s imunoanalýzami a molekulárnymi diagnostickými testami pre priamu kvantifikáciu a analýzu proteínov alebo RNA asociovaných s vezikulami [87; 119]. Techniky založené na imunoafinitnom záchyte sa spoliehajú na použitie protilátok (Anti-bodies, Ab) namierených proti špecifickým markerom (Antigénom, Ag), ktoré sú predmetom záujmu. Vybrané AB sa môžu imobilizovať na magnetické častice či na pevný povrch ako u metódy ELISA [106].

Imunomagnetické guľôčky sú sférické magnetické častice sú potiahnuté povrchovými funkčnými skupinami, ktoré zahŕňajú: aktivovanú karboxylovú skupinu, aminoskupinu, epoxyskupinu, hydroxyskupinu, tozylskupinu a N-hydroxysukcinát vid' *Obrázok 7*. Magnetické častice zvyčajne interagujú s povrchovými molekulami, ako je streptovidín, biotín, proteín A, proteín G, či s imobilizovanou špecifickou protilátkou, ktorá sa špecificky viaže na cieľovú molekulu vid' *Obrázok 8* [120]. Imunomagnetická extrakcia exozómov je založená na špecifickej väzbe medzi týmito Ab a určitými receptorovými markermi (Ag) prítomných na povrchu exozómov, kam sa zaraďujú napríklad CD9, CD63, CD81, či EpCAM a slúžia na extrakciu exozómov použitím metód IA záchytu. V tomto prípade imunomagnetické častice sú najskôr potiahnuté Ab proti konkrétnemu markeru, a tieto Ab sú inkubované so vzorkou za vzniku komplexov exozómy-magnetické častice [94; 119].



Obrázok 7: A) Modifikovaný povrch magnetických častíc rôznymi funkčnými skupinami či biomolekulami ako špecifické Ab; B) Využitie modifikovaných magnetických častíc ako pevného nosiča pri izolácii molekúl z biologických tekutín. Prevzaté a modifikované z [120]

IA metódy preukázali rozsiahly diagnostický a terapeutický potenciál. Tauro a kol. vykonali komplexné vyhodnotenie UC, centrifugácie s hustotným gradientom a imunoafinitného záchytu pomocou magnetických častíc potiahnutých anti-EpCAM, aby sa izolovali TEXs súvisiace s rakovinou hrubého čreva a konečníka. Dospeli k záveru, že IA záchyt je najlepšou metódou pre izoláciu exozómov, ako sa preukázalo dvojnásobne väčším výt'azkom v porovnaní s ostatnými dvoma prístupmi [119]. Mizutani a kol. vyvinuli IA metódu na izoláciu TEXs rakoviny prostaty z krvi. Ich štúdia ukázala, že pacienti s agresívnou rakovinou prostaty vykazovala vyššie hladiny exozómov spojených s rakovinou prostaty v krvi [121]. Aj keď sa imunoafinitné magnetické častice často používajú, táto metóda však nie je bez výziev. IA záchyt s magnetickými časticami je účinný iba vtedy, keď vysoký podiel exozómov prezentuje cieľový proteín [116]. Samozrejme je pomerne ťažké eluovať exozómy z magnetických častíc, čo môže predstavovať hlavné obmedzenie, pretože viazané exozómy potom nemôžu byť použité v následných experimentoch. K ďalším nevýhodám sa radia náklady za činidlá alebo práca pri neutrálnom pH a koncentrácii nefyziologických solí, používaných pri premývaní či dokonca samotnej elúcii. Takto často dochádza k ovplyvneniu biologickej aktivity exozómov, čo obmedzuje možnosti ich ďalšieho skúmania [94; 106].

Test ELISA, v ktorom sú Ab namierené proti markeru (Ag) – predmetom záujmu, je opäť typom techniky založenej na IA záchyťe používanej na izoláciu a kvantifikáciu exozómov zo vzoriek

plazmy, séra a moču. Vzorka obsahujúca exozómy sa preniesie do jamky s imobilizovanou Ab a exozómy exprimujúce Ag sa týmto spôsobom naviažu na doštičku kvôli špecifickej interakcii Ag-Ab. Nezachytené exozómy a obsah vzorky sa vymyjú a imobilizované exozómy sa môžu detegovať pomocou sekundárnej Ab obsahujúcej absorpčnú značku (konjugát). Výsledky ELISA vyjadrené hodnotami absorbancie ako forma okamžitého odčítania výťažku a špecificity exozómov. Hodnoty absorbancií sa môžu tiež extrapolovať, aby sa kvantifikovali zachytené exozómy pomocou kalibrácie s použitím štandardov so známym počtom exozómov [106; 122]. Špecifickosť a výťažok exozómov pomocou IA prístupu založeného na mikrodoštičkách vo svojej štúdií Zarovni a kol. hodnotili s ohľadom na UC. Tento IA záchytný prístup založený na ELISA priniesol porovnateľné výsledky s hodnotami získanými UC s oveľa menším objemom vzorky, čo demonštruje nadradenosť ELISA techniky nad UC. Navyše výťažok RNA získaný z izolovaných exozómov bol vyšší ako pri metódy UC. Exozomálna RNA bola extrahovaná už zo 400 ul plazmy, čo bolo porovnateľné s množstvom získaným z 2,5 ml tej istej vzorky s UC [87].

Hlavnou výhodou magnetických častíc oproti ELISA je to, že častice poskytujú väčšiu plochu povrchu na zachytenie exozómov, čo vedie k vyššej účinnosti izolácie. Navyše pri použití magnetických častíc neexistuje horná hranica počiatočného objemu vzorky, zatiaľ čo test ELISA na báze mikrodoštičiek má maximálny objem vzorky 100 µl, ktorý sa môže preniesť do jamky typickej 96-jamkovej mikroplatne [106].

3.2 Metódy charakterizácie exozómov

Po izolácii sa purifikované vzorky exozómov charakterizujú rôznymi zobrazovacími a biochemickými technikami. Je ťažké charakterizovať 3D štruktúru jednotlivých exozómov z dôvodu ich nanometrických rozmerov [123]. Nedávno bolo vyvinutých niekoľko charakterizačných a validačných metód na výskumné aj klinické účely s cieľom analyzovať čistotu exozómov a kvantifikovať ich obsah. Tieto metódy zahŕňajú transmisnú elektrónovú mikroskopiu (Transmission Electron Microscopy, TEM), skenovaciu elektrónovú mikroskopiu (Scanning Electron Microscopy SEM), mikroskopiu atomárnych síl (Atomic Force Microscopy, AFM), analýzu sledovania nanočastíc (Nanoparticle Tracking Analysis, NTA), dynamický rozptyl svetla (Dynamic Light Scattering, DLS). Medzi ďalšie prístupy patria imunoblotovacie techniky akou je napríklad Western blot (WB) či najnovšie a najviac rozvíjané metódy mikrofluidika a elektrochemické biosenzory [17; 43].

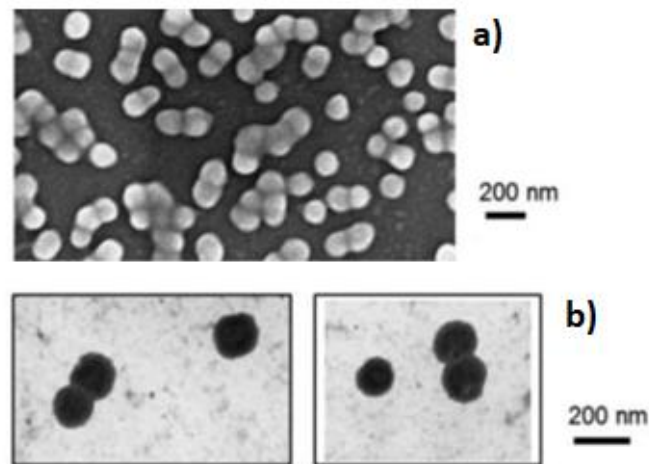
3.2.1 Elektrónové mikroskopické metódy

Elektrónová mikroskopia (EM) je potrebný nástroj na charakterizáciu morfológie exozómov, pretože častice, či vezikuly menšie ako 300 nm sú v optických metódach neviditeľné. Kvôli priemeru exozómov menších ako optické vlnové dĺžky bol TEM vyvinutý ako náhrada za konvenčnú svetelnú mikroskopiu [14; 124]. Prvú štrukturálnu charakterizáciu exozómov, pochádzajúcich z ovčích retikulocytov, pomocou TEM uskutočnil Pan a kol. už v roku 1985 [125]. TEM sa používa na vytvorenie obrazov elektróny namiesto fotónov. Lúč elektrónov prechádza vzorkou, kde sa generujú sekundárne elektróny zberané a upravované pomocou špeciálnych šošoviek. Najlepšie dosiahnuteľné obrazové rozlíšenie TEM závisí do veľkej miery od priestorovej stability elektrónového lúča v kombinácii s chemickou stabilitou vzorky. Pretože vlnová dĺžka elektrónov je o viac ako tri rády kratšia ako vlnová dĺžka viditeľného svetla, rozlíšenie TEM môže byť nižšie ako 1 nm [126]. V štúdiách biologických vzoriek, ako napríklad Pisitkun a kol. využili túto módu pri identifikácii a proteomickej analýze exozómov z moču pacientov s Diabetes mellitus typu I [127].

Po dlhší čas sa verilo, že všetky EVs majú sférický tvar a veľmi konkrétne a pomerne obmedzené rozdelenie veľkosti. Analýzou negatívneho zafarbenia metódou TEM Colombo a kol. pozorovali, že sférické exozómy a EVs majú heterogénny tvar a boli popísané ako pohárikovité. Z čoho vyplýva, že v niektorých prípadoch môže aj elektrónový lúč poškodiť biologické vzorky [128]. Nedávno boli EVs tiež skúmané pomocou novej techniky kryo-elektrónová mikroskopia (Kryo-TEM), ktorá nepoužíva fixačné látky a umožňuje tak študovaným vezikulám udržiavať si ich prirodzený stav [22; 129]. Na základe tejto techniky Gould a Raposo v roku 2013 zistili, že morfológia „pohárikového tvaru“ bola len artefaktom pochádzajúcim z krokov fixácie zahrnutých v technike negatívneho farbenia a že morfológia EVs je oveľa rozmanitejšia, ako sa pôvodne predpokladalo [130].

Aj keď sa TEM považuje za štandardný nástroj na charakterizáciu morfológie exozómov, jej nedostatkom sú artefakty fixácie a biologicky nekompatibilnými podmienkami, ako sú nízka teplota a vysoké vákuum [123]. Z tohto dôvodu SEM predstavuje alternatívny prístup, ktorý sa nedávno objavil. Vo všeobecnosti TEM aj SEM vyžadujú ultracentrifugáciu na izoláciu exozómov a zahŕňajú viaceré kroky spracovania vzorky pred identifikáciou, ktoré sa však líšia pri týchto dvoch metódach [131]. Pri porovnávaní TEM a SEM je však potrebné zvážiť určité kompromisy. Wu a kol v ich štúdií z roku 2015 prezentovali, že príprava vzoriek TEM vyžaduje viac krokov v porovnaní so SEM. Obrazy EVs získané zo SEM (viď *Obrázok 9*) vykazovali neporušené membránové štruktúry a morfológia sa zreteľne líšila pri všetkých

typov EVs. Toto zistenie naznačuje, že SEM je platnou alternatívou k TEM pre priame zobrazovanie EVs, s výhodami založenými na zlepšení spracovania vzoriek [132].

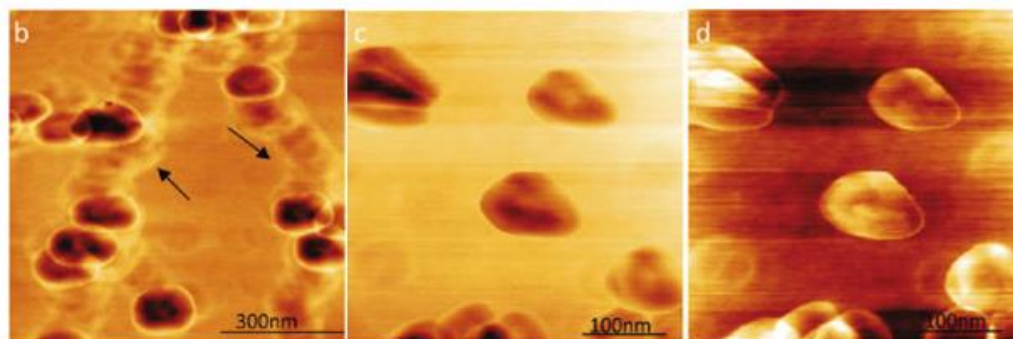


Obrázok 8: Porovnanie metód SEM (a) a TEM (b) pri zobrazení EVs z myších buniek melanómu [132]

3.2.2 Mikroskopia atomárných síl

Morfologická klasifikácia EVs nie je široko akceptovaná, najmä preto, lebo izolácie vezikul a analýzy s EM sú náchylné na artefakty. AFM poskytuje informácie týkajúce sa veľmi širokého rozdelenia veľkosti EVs, pričom sa počíta ich priemer. Výhodou AFM je minimalizácia prípravy vzorky pomocou merania EVs v ich pôvodných podmienkach. Z Obrázka 10 je vidieť snímky exozómov pochádzajúce zo slín získané touto metódou. Vykazujú podobnú morfológiu a rozdiely v kontraste sa prisudzujú rozdielnému konštrukčnému zloženiu (RNA, lipidy, proteíny) a schopnosti agregácie nezávislej od interexozomálnej fúzie [131]. Mikroskop atómovej sily sa skladá z konzolového ramena s ostrým hrotom na konci, ktorý sníma povrch vzorky bez fyzického kontaktu. Pohyby špičky sa merajú a pomocou softvéru sa vytvorí trojrozmerný obraz [126]. Semikvantitatívna proteomická a transkripčná analýza založená na populáciách exozómov, nie na jednotlivých vezikulách, nie je postačujúca na analýzu proteínov / receptorov na jednotlivých exozómov, a preto spravidla chýba štruktúrna a povrchová molekulárna charakterizácia exozómov. V štúdií Sharma a kol. z roku 2010 uviedli subštruktúru exozómov z ľudských slín založenú na novej ultracitlivej AFM s nízkymi silami a korelovali škálu štruktúr získanú pomocou AFM s vysokým rozlíšením ~ 1 nm a nízkym napätím [131]. Hoo a kol. zistili, porovnávaním AFM a DLS pri pozorovaní distribúcie nanočastíc, že vďaka laterálnemu rozlíšeniu 3 nm a vertikálnemu rozlíšeniu $< 0,1$ nm je AFM vhodná na detekciu veľkosti a pri polydisperzných

vzorkách vykazuje lepšie výsledky ako DLS [133]. Siedlecki a kol. i Yuana a kol. vo svojich štúdiách ukázali, že AFM sa môže použiť na meranie relatívnej distribúcie veľkosti vezikúl v ich fyziologickom stave [134; 135].



Obrázok 9: Zobrazenie morfológie exozómov pochádzajúce zo slín pomocou AFM metódy [131]

3.2.3 Dynamický rozptyl svetla

Technika DLS je známa aj ako fotónová korelačná spektroskopia alebo kvázi elastický rozptyl svetla. Pri tejto technike prechádza monochromatický a koherentný laserový lúč suspenziou častíc, ktorý určuje relatívnu distribúciu veľkosti častíc v rozmedzí od 1 nm do 6 μm v koloidných suspenziách [126; 133; 136]. Častice v tekutine sa kontinuálne pohybujú v rôznych smeroch v dôsledku nepretržitých zrážok s molekulami rozpúšťadla. To spôsobuje náhodný pohyb častíc nazývaný Brownov pohyb. Distribúcia rýchlosti častíc závisí od teploty (T), viskozity (η) a hydrodynamického priemeru častíc (d). Čím sú častice menšie, tým rýchlejší je ich pohyb. DLS funguje dobre pri určovaní veľkosti monodisperzných vzoriek a pri monitorovaní zmeny vo vzorke, ako je napríklad agregácia. Detekcia distribúcie veľkosti polydisperzných vzoriek je menej presná, pretože meraná distribúcia veľkosti je vysoko ovplyvnená prítomnosťou malého počtu väčších častíc, ako sú doštičky alebo iné kontaminanty, ktoré poskytujú výraznejší rozptyl svetla ako malé vezikuly [126]. V štúdiu z roku 2004 Bootz a kol. porovnávali výhody DLS a SEM [137]. Hlavnými výhodami DLS sú krátka doba potrebná na vykonanie meraní a relatívne nízka cena prístroja. Táto metóda má však niekoľko úskalí, najmä čo sa týka vplyvu prachových častíc alebo malých množstiev veľkých agregátov, ktoré môžu brániť stanoveniu veľkosti, ak hlavná zložka vykazuje zreteľne menšiu veľkosť [137; 138]. Ďalšou nevýhodou tejto techniky je neschopnosť dodať akékoľvek biochemické údaje ani informácie o bunkovom pôvode EVs [136].

3.2.4 Prietoková cytometria

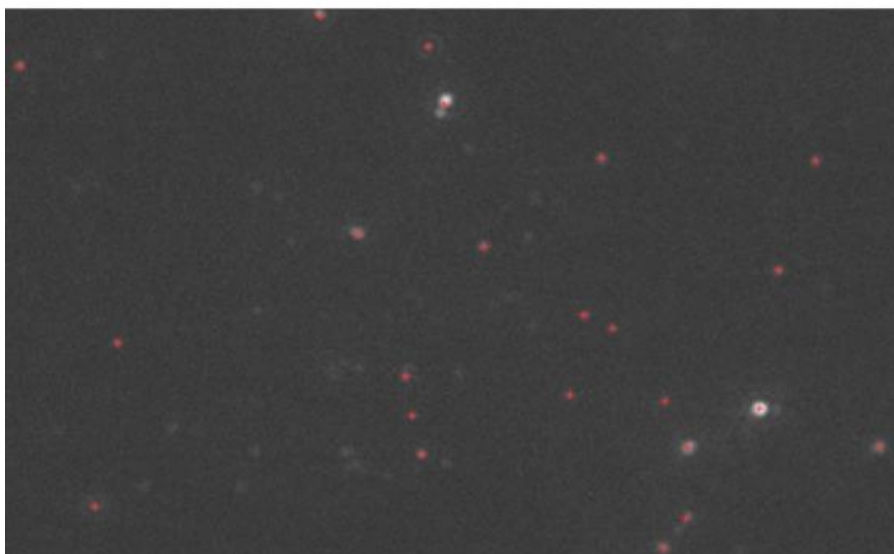
Táto metóda sa často považuje za fyzikálnu formu analýzy, pretože umožňuje vizuálne pozorovanie exozómov, no vyžaduje si však určité znalosti týkajúce sa proteínového zloženia exozomálnych vezikúl, preto sa tiež považuje za formu kompozičnej analýzy. Zatiaľ čo technológia FC rýchlo postupuje, pričom novšie prístroje majú detekčné limity už od 100 do 200 nm, väčšina prístrojov má detekčnú hranicu 300 – 500 nm, ktorá je oveľa väčšia ako veľkosť exozómov [126; 139]. U FC nastávajú problémy, keď je exozomálna koncentrácia vysoká alebo ak počas procesu izolácie dôjde k agregácii exozomálnych vezikúl, na ktorú upozorňujú aj Pedersen a kol. vo svojej práci [140]. Agregácia vedie k pozorovaniu viacerých vezikúl naraz, čo vedie k nepresným údajom [106; 132]. Vyžaduje teda imobilizáciu exozómov k povrchu polystyrénových mikrosférických častíc so známou veľkosťou od 0,5 do 0,9 μm aby sa dali pozorovať prietokovým cytometrom [141]. Vezikuly sú tak vystavené fluorescenčne konjugovanej Ab namierenej proti markeru, o ktorom je známe/predpokladá sa, že bude exprimovaný na exozomálnom povrchu. Prietokový cytometer vedie vezikuly laserovým lúčom v hydrodynamicky sústredenom prúde tekutiny. Jeden detektor je umiestnený v priamke s laserovým lúčom o vlnovej dĺžke 488 nm bežne používanej pri FC a meria predný rozptyl svetla (Forward Scatter, FSC) pod uhlom 0,5 – 5°. Druhý detektor zaznamenáva bočný rozptyl svetla (Side Scatter, SSC) kolmo na lúč. Častice väčšie ako vlnová dĺžka svetla, prevažne rozptyľujú svetlo smerom dopredu a preto je FSC spojená s veľkosťou vezikúl. Častice menšie ako vlnová dĺžka, ako sú organely, rozptyľujú relatívne viac svetla v kolmom smere, takže SSC je spojená s komplexnou anatómiou buniek či s typom vezikúl [136; 142].

Exozomálne vezikuly konjugované s časticami a fluorescenčnou Ab sa dajú pozorovať pod epifluorescenčným mikroskopom. Keď vzorka prechádza laserom prietokového cytometra, vysiela fluorescenčný signál, ktorý je detegovaný. To nielen umožňuje vysoko výkonnú analýzu exozómov, ale tiež umožňuje kvantifikáciu alebo klasifikáciu exozómov na základe expresie povrchových markerov [106]. Pospíchalová a kol. vo svojej práci zjednodušili protokol detekcie fluorescenčne značených exozómov a mikrovezikúl pri FC po predchádzajúcej izolácii vezikúl centrifugáciou s hustotným gradientom [143].

3.2.5 Analýza sledovania nanočastíc

NTA bola uvedená na trh už v roku 2006. Prvýkrát túto metódu na monitorovanie EVs použili Sokolova a kol. v roku 2011 na charakterizáciu exozómov z bunkových kultúr (viď *Obrázok 11*) [144]. NTA umožňuje stanovenie veľkosti častíc aj ich koncentrácie. Analogicky k DLS veľkosť častíc sa odhaduje pomocou Stokes-Einsteinovej rovnice, kde je koeficient difúzie

založený na Brownovom pohybe častíc [33; 126]. Laserové svetlo sa rozptyľuje, keď interaguje s časticami v komore a rozptýlené svetlo je sústredené mikroskopom s pripojenou CCD kamerou. Kamera zachytáva pohyb častíc vo videu a NTA softvér potom na základe toho odhaduje veľkosť a koncentráciu týchto častíc. NTA je teda schopná určiť veľkosť častíc s priemerom 10 až 1000 nm, kam sa radia aj exozómy [106; 145]. Okrem výhod má technika NTA aj určité obmedzenia. Jedným z nich je správne riedenie vzorky pre účely merania, čo môže byť problematické najmä v prípade obmedzeného objemu [136]. Ako uvádzajú Gardiner a kol. vo svojej štúdií hlavnou prekážkou je nájdenie „správneho“ zried'ovacieho faktoru, aby kamera mohla zaregistrovať všetky vezikuly prítomné vo vzorke, aby tak nedošlo k prekryvaniu väčšieho vezikula maskujúceho menšie. Podobne ako pri iných metódach založených na Brownovom princípe pohybu, maskovania menších vezikúl väčšími môže samozrejme skresliť výsledky, vďaka čomu sú nespoľahlivé [146]. Ako uvádzajú Soo a kol., navrhovaná optimálna koncentrácia vzorky pre meranie metódou NTA je v rozmedzí 2×10^8 až 20×10^8 častíc/ml [147].

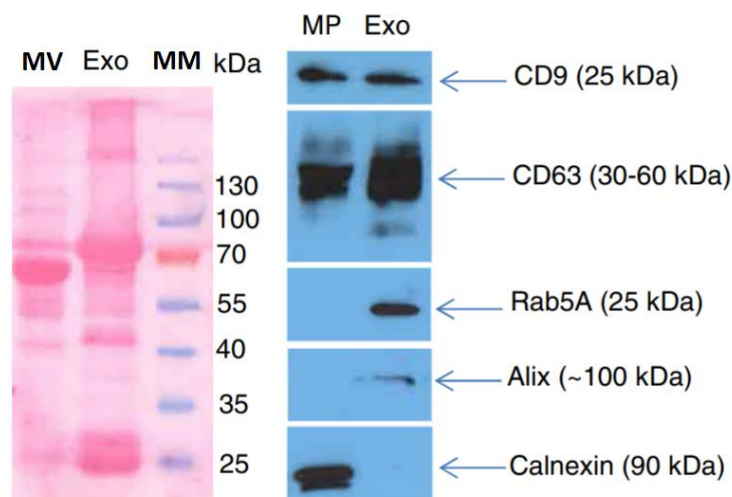


Obrázok 10: Snímok exozómov z HEK bunkovej kultúry získaný metódou NTA [144]

3.2.6 Imunoanalýza

Princípy imunoblotingu alebo Semi-Dry Western blottingu (Semi-Dry WB) zahŕňajú afinitnú väzbu Ag (cieľové proteíny prítomné na povrchu EVs) a Ab, ktorá špecificky rozpoznáva Ag. Na rozdiel od FC, Semi-Dry WB neumožňuje pozorovanie neporušených vezikúl. V tomto prípade vezikuly podliehajú lýze a proteíny sa tak denaturujú a redukujú počas prípravy vzorky. Po denaturácii sa proteíny separujú pomocou polyakrylamidovej elektroforézy za prítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE) a potom sa prenesú na nitrocelulózu alebo

polyvinylidénfluoridovú (PVDF) membránu [148]. Zostávajúce otvorené póry na membráne sa zablokujú proteínom napr. BSA a / alebo detergentom a následne sa vystavia primárnej Ab namierenej proti požadovanému Ag zachytenému na povrchu membrány, ktorá ho v ideálnom prípade rozpozná. Membrána je potom vystavená sekundárnej Ab (konjugát), ktorá je namierá proti druhu pôvodnej (primárnej) Ab použitej na rozpoznanie Ag. Ako primárne Ab sa používajú napr. molekuly anti-CD63, anti-CD9 či anti-EpCAM, ktoré použili aj v štúdiu Zarovni a kol. (viď *Obrázok 12*), alebo Weng a kol., pri detekcii TEXs izolovaných pomocou imunomagnetických častíc alebo imunoprecipitácie za použitia PEG [87; 116]. Sekundárna Ab je detegovaná vďaka svojej fluorescenčnej značke alebo skupinou chrovej peroxidázy či alkalickéj fosfatázy spojenou s konjugátom [106]. Metodika WB patrí medzi najbežnejšie používané analytické metódy na analýzu exozómov z dôvodu ľahkého použitia, širokej dostupnosti a schopnosti detegovať exozomálne povrchové a interné proteíny, ako dokazujú mnohé štúdie ako napr. Böing a kol., Pedersen a kol., či Vojtech a kol. [95; 140; 149].



Obrázok 11: Detekcia sérových exozómov (Exo) metódou Semi-Dry WB na základe prítomnosti špecifických proteínov s príslušnými molekulárnymi hmotnosťami po predošlej SDS-PAGE [87].

3.2.7 Mikrofluidné systémy

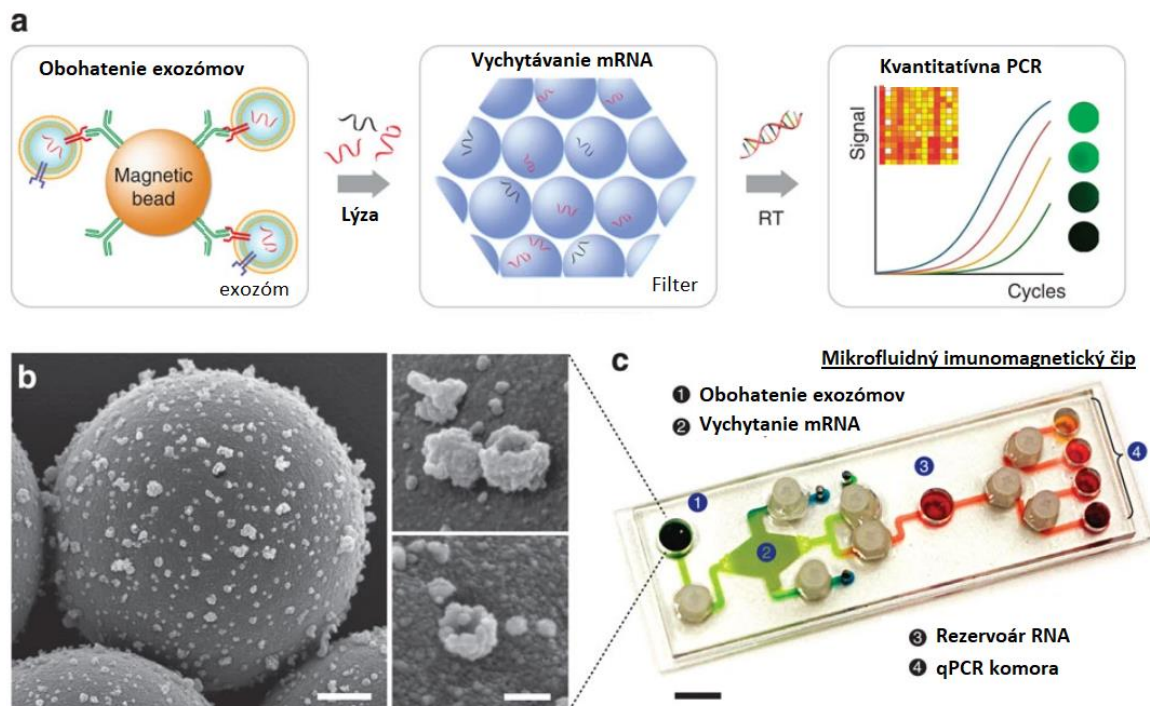
V posledných rokoch sa mikrofluidické systémy (Microfluidic, Mf) používajú na zlepšenie účinnosti, rýchlosti a nákladov na čistenie exozómov. Tieto prístupy zahŕňajú použitie imunoafinitných častíc, mikrofluidných filtračných systémov a mikrofluidických laminárnych prietokových systémov. Niektoré štúdie používajú kombináciu filtračných aj imunoafinitných systémov [117]. Filtre pri Mf systéme sa používajú na triedenie molekúl pomocou rôznych veľkostí pórov. Siwoo Cho a kol. použili systém založený na filtrácii, ktorý využíva prichytenie

EVs na nanoporéznej membráne a elektroforetickú migráciu [150]. Výsledná peleta EVs sa fyzicky odlúpne z membrány, čo vedie k minimálnej ireverzibilnej deštrukcii EVs. Nevýhodou tohto typu je, že väčšie molekuly blokujú filtračné póry, čo časom znižuje filtračnú kapacitu membrány [117].

Mikrofluidný imunoafinitný systém (Microfluidics-based Immunoaffinity Capture, Mf-IAC) podobne ako pri imunoafinitných časticiach identifikuje fluidný systém pomocou protilátok, aby sa zachytili exozómy. Pretože protilátky sú imunošpecifické, tento systém umožňuje účinný a vysoko koncentrovaný zber exozómov. Mf-IAC bol použitý v štúdiách zameraných na diagnostiku chorôb [117]. Zheng a kol. vyvinuli mikrofluidný prístup využívajúci imunomagnetické častice a obohatený prípravok plazmatických exozómov. Táto metóda sa použila na diagnostiku rakoviny vaječníkov v krvi pomocou multiplexného merania exozomálnych nádorových markerov, kde vykázala významnú diagnostickú silu [151].

Technológie idú neustále dopredu a aj pri tejto technike to nie je inak. Shao a kol. vyvinuli magneticky separujúci systém Mf-IAC využívajúci magnetické zachytné častice pre izolovanie EVs s vysokým výťažkom z krvi pacienta s glioblastómom, s následnou extrakciou a analýzou exozomálnej mRNA. Tento separujúci systém možno vidieť na *Obrázku 13* [152]. Chen a kol. použili povrchovo modifikovaný mikrofluidický kanál s drážkami v tvare „rybacej kostry“ na efektívne zachytenie EVs [153]. Ashcroft a kol. navrhli sľudový povrch s protilátkovým plášťom na efektívnu izoláciu EVs z plazmy [154]. Kanwar a kol. efektívne zachytávali cirkulujúce EVs pomocou platformy „ExoChip“. Tento čip sa skladá z injektora v tvare Y, hadovitého miešača tekutín na exozómové zachytenie na báze častíc, ďalej z mikrokomy s vymeniteľným magnetom na zhromažďovanie a detekciu exozómov. Do komory sa vstrekla zmes Ab značených jedinečnými fluorescenčnými farbivami kvôli rozlíšeniu subpopulácii exozómov pre multikolorimetrické fluorescenčné zobrazenie. Celková analýza pri plazmatických vzorkách o objeme 20 µl bola dokončená za približne 40 minút [151].

Mf a miniaturizované prístroje typu „lab-on-a-chip“ sú atraktívne pre lekársku diagnostiku a analýzu krvi. Malé rozmery Mf zariadení, objemy vzoriek a minimálne potrebné množstvo reagentov tak umožňujú zrýchlenie reakčných časov, zvýšenú citlivosť a zníženie procedurálnych nákladov [117; 155].



Obrázok 12: Príklad magneticky separujúceho Mf systému pre izoláciu a detekciu exozomálnej mRNA z krvi. Prevzaté a modifikované z [152]

4 Experimentálna časť

4.1 Prístroje a pomôcky

- mikropipety (Eppendorf, Hamburg, Nemecko)
- mikroskúmavky (BioTech a.s., Praha, ČR a Eppendorf, Hamburg, Nemecko)
- automatické pipety Eppendorf Research (Eppendorf, Hamburg, Nemecko)
- centrifúga MiniSpin (Eppendorf, Hamburg, Nemecko)
- pH Meter Orion 420 (Thermo Electron Corporation, Massachusetts, USA)
- rotátor Bio RS-24 Mini (Biosan, Riga, Lotyšsko)
- Termostat TDB-100 Dry block Heating (Biosan, Riga, Lotyšsko)
- Termomixér Thermo-Shaker TS-100 (Biosan, Riga, Lotyšsko)
- analytické váhy Scaltec SBC 32 (Scaltec Instruments, GmbH, Göttingen, Nemecko)
- predvážky KERN 440-33N (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Nemecko)
- Vortex V1 (Biosan, Riga, Lotyšsko)
- stanica pre denzitometrické vyhodnotenie gélov ChemiDoc™ XRS+ Systém s ImageLab™ 5.0 softvérom (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- stanica pre produkciu redestilovanej vody TKA Smart2Pure (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- Termoblok Block heater Grant Bio BTD (Grant Instruments Ltd., Cambridgeshire, UK)
- trepačka Vortex mixer Wx (Velp Scientifica, Usmate, Taliansko)
- magnetický separátor Dynal – MPC-S (Dynal Biotech, Oslo, Nórsko)
- aparátúra pre vertikálnu elektroforézu Mini-PROTEAN 3 (Bio-Rad, USA)
- zdroj napätia PowerPac 200 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Hamilton The Measure of Excellence™ (Hamilton Company, Reno, Nevada, USA)
- Trepačka Mini Rocker MR-1 (Biosan, Riga, Lotyšsko)
- Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Dot-blot zariadenie (SciePlast Ltd., Cambridge, Veľká Británia)

4.2 Polyakrylamidová gélová elektroforéza v prostredí dodecylsulfátu sodného (SDS – PAGE)

Použité chemikálie:

- Akrylamid (Fluka, Buchs, Švajčiarsko)
- N,N'-metylen-bis-akrylamid, C₇H₁₀N₂O₂, 98% (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO. USA)

- Tris(hydroxymethyl)aminomethan, TRIS, $C_4H_{11}NO_3$ (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO. USA)
- Dodecylsulfát sodný, SDS (Fluka, Buchs, Švajčiarsko)
- Kyselina chlorovodíková 35%, HCl (Penta, Chrudim, CZ)
- Persíran amónny, APS p.a., $(NH_4)_2S_2O_8$ (Lachema, Neratovice, CZ)
- N,N,N,N-tetramethylenethylendiamin, TEMED, $C_6H_{16}N_2$ (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO. USA)
- Glycín, $C_2H_5NO_2$ (Merck, Darmstadt, Nemecko)
- 2-Butanol, $C_4H_{10}O$, 99% (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO. USA)

Vzorkové pufre:

- Roztok G: 2x Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Roztok F: 2x Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) + 2-Merkaptoethanol (Fluka, Buchs, Švajčiarsko)

Molekulové markery:

- Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standard, 10 – 250 kDa (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Precision Plus Protein™ Dual color Protein Standard, 10 – 250 kDa (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)

Použití roztoky:

Roztok A: 30% zmes akrylamidu a bisakrylamidu (8,76 g akrylamidu a 0,24 g bisakrylamidu rozpustené v 15 ml destilovanej vode (dH_2O), zmes sa nechala nabobtnať, potom doplnené na objem 30 ml s dH_2O)

Roztok B: 1,5 M TRIS-HCl pufer pH 8,8 (5,445 g TRISu rozpustené v 30 ml dH_2O , pH upravené pomocou 6 M HCl)

Roztok C: 1 M TRIS-HCl pufer pH 6,8 (4,84 g TRISu rozpustené v 40 ml dH_2O , pH upravené so 6 M HCl)

Roztok D: 10% roztok SDS (1 g SDS rozpustený v 10 ml dH_2O)

Roztok E: 10% roztok APS (100 mg APS rozpustených v 1 ml dH_2O)

Roztok G: komerčný vzorkový pufer G

Elektródový pufer: 0,025 M TRIS; 0,192 M glycín; 0,1% SDS (3,025 g TRISu, 15 g glycínu, 1 g SDS, rozpustené v 1000 ml dH_2O)

Tabuľka 1: Objemy použitých roztokov pre prípravu gélov na SDS – PAGE

	10% DELIACI GÉL	12% DELIACI GÉL	5% ZAOSTROVACÍ GÉL
DESTILOVANÁ VODA	2 ml	1,68 ml	1,4 ml
ROZTOK A	1,65 ml	2,0 ml	0,330 ml
ROZTOK B	1,25 ml	1,25 ml	X
ROZTOK C	X	X	0,250 ml
ROZTOK D	0,05 ml	0,05 ml	0,02 ml
ROZTOK E	0,05 ml	0,05 ml	0,02 ml
TEMED	0,002 ml	0,002 ml	0,002 ml

Postup:

Na začiatku sa zostavila aparatúra, kde sa do držiakov uchytili vopred očistené sklá dH₂O a liehom. Nasledovalo upevnenie do stojanu. Medzi sklami bol priestor o šírke 0,75 µm. Podľa potreby sa pripravil 10% alebo 12% deliaci gél podľa vyššie uvedenej *Tabuľky 1*, prevrstvený 2-butanol kvôli vyschnutiu, a nechal sa spolymerizovať po dobu 20 – 30 min. Potom sa odsal sa 2-butanol pomocou filtračného papiera, pripravil 5% zaostrovací gél, ako je uvedené v *Tabuľke 1* a napipetoval sa medzi sklá, kde sa ešte nasadila šablóna pre vytvorenie 10- alebo 15-jamiek. Opäť sa gél nechal spolymerizovať 20 – 30 min. Následne sa gél upevnil do aparatúry pre SDS – PAGE. Vy brala sa šablóna a jamky sa prepláchli elektródovým pufrom. Vnútro aparatúry sa naplnilo elektródovým pufrom.

Pomocou Hemiltonky sa nadávkovali vzorky (VZ) v pomere 10 µl VZ + 10 µl vzorkového pufru G/F pri 10 jamkových géloch (7,5 µl + 7,5 µl u 15 jamkových géloch), v prípade následného blotingu na membránu sa dávkovalo v pomere 5 µl VZ + 5 µl vzorkového pufru G/F na jamku. Objem molekulového markeru pripadajúceho na jamku bol 2 až 3 µl.

Aparatúra sa uzatvorila vekom a pripojila sa ku zdroju. Nastavili sa hodnota konštantného napätia 180 V a prúdu 30 mA/1 gél. Doba elektroforetického delenia proteínov trvala 45 až 55 min v závislosti od typu deliaceho gélu a nasledujúceho postupu ako v prípade blotingu na membránu. Po skončení delenia sa aparatúra odpojila od zdroja, gél sa vyňal zo skiel a umiestnil sa do petriho misky, kde sa prepláchol dH₂O. Ďalej nasledovalo farbenie alebo blotting na nitrocelulóзовú membránu pre ďalšie analýzy oddelených proteínov.

4.2.1 Farbenie gélov s koloidným roztokom amoniakálneho striebra

Použité chemikálie:

- Kyselina octová 99%, CH₃COOH (Penta, Chudim, CZ)
- Ethanol 96%, CH₃COOH (Lach:ner, Neratovice, CZ)
- Glutaraldehyd 50% (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO. USA)
- Dusičnan strieborný, AgNO₃ (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO. USA)
- Hydroxid amonný, NH₄OH 25% (Merck, Darmstadt, Nemecko)
- Hydroxid sodný, NaOH (Penta, Chrudim, CZ)
- Formaldehyd, CH₂O (Penta, Chrudim, CZ)
- Kyselina citrónová bezvodná (Fluka, Buchs, Švajčiarsko)

Použité roztoky:

- Fixačný roztok: 5% kyselina octová + 50% ethanol (50 ml kyseliny octovej, 500 ml ethanolu, doplnené na objem 1000 ml dH₂O)
- Roztok 10% glutaraldehydu: 10 ml 50% + 40 ml dH₂O
- Roztok 20% dusičnanu strieborného: 2 g AgNO₃ rozpustené v 10 ml dH₂O
- Roztok 9 M hydroxidu sodného: 3,6 g NaOH sa rozpustené v 6 ml dH₂O, doplnené na objem 10 ml s redestilovanou vodou (ddH₂O)
- Vyvolávací roztok: 0,05% kyselina citrónová + 0,04% formaldehyd (250 mg kyseliny citronovej, 540 µl 37% formaldehydu, doplnené na 500 ml s dH₂O)
- Ustaloovací roztok: 5% kyselina octová (50 ml kyseliny octovej, doplnené na 1000 ml s dH₂O)
- Roztok amoniakálneho striebra: zmes (1,4 ml amoniaku, 239 µl 9 M NaOH, 21 ml) titrované s 20% AgNO₃ až do vzniku svetlo hnedého zákalu, potom sa roztok doplnil na objem 100 ml s dH₂O

Postup:

Po rozdelení proteínov SDS – PAGE sa gél prepláchol dH₂O v petriho miske. Následne sa aplikoval fixačný roztok, nechal sa pôsobiť 30 – 40 min pri izbovej teplote (Room Temperature, RT). Po fixácii sa gél rehydratoval v dH₂O po dobu 30 min pri RT. Potom sa inkuboval v 50% glutaraldehydu 30 min. Nasledovala rada premývania gélu dH₂O v intervale šesťkrát po 10 min. Napokon sa aplikoval koloidný roztok AgNO₃ po dobu 12 min pri RT. Gél sa opláchol dH₂O, prevrstvil vyvolávacím roztokom, ktorý sa nechal pôsobiť až do zviditeľnia markeru

a rozdelených proteínov. Napokon sa gél previedol do ustalovacieho roztoku, v ktorom sa mohol aj uskladniť.

4.2.2 Farbenie gélov s Commasie brilliant blue

Použité roztoky:

- Fixačný roztok: 5% kyselina octová + 50% ethanol (viď farbenie striebrom)
- Farbiaci roztok: Komerčný roztok pre farbenie: Bio-Safe™ Commasie Stain (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Odfarbovací roztok: dH₂O

Postup:

Začiatok je podobný ako u farbení koloidným roztokom AgNO₃, kde sa po fixácii a následnej rehydratácii v dH₂O na gél aplikuje komerčný roztok Commasie brilliant blue. Gél sa inkuboval pri RT po dobu 60 min. Následne sa gél premýval viackrát v dH₂O minimálne 1 hodinu.

4.3 Semi – Dry Western blot (WB)

Použité chemikálie:

- Fosfátový pufer s 0,1% Tween (PBS-T)
- Chlorid sodný, NaCl (Lach:ner, Neratovice, CZ)
- Dihydrogénfosforečnan draselný, KH₂PO₄ (Lach:ner, Neratovice, CZ)
- Dodekahydrát hydrogénfosforečnan disodný, NaHPO₄·12 H₂O (Lach:ner, Neratovice, CZ)
- Chlorid draselný, KCl (Penta, Chrudim, CZ)
- Tween 80 (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO. USA)
- Tween 20 -pripravený z Tween 80

Primárne protilátky:

- monoklonálne myšie IgG1 anti-ľudské CD81 protilátky, TAPA-1, 26 kDa, klon 5A6, koncentrácia 0,5 mg/ml (BioLegend Inc, San Diego, CA, USA)
- monoklonálne myšie IgG1 anti-ľudské CD63 protilátky, LEAF™, 53 kDa, klon H5C6, koncentrácia 1 mg/ml (BioLegend Inc, San Diego, CA, USA)
- polyklonálne králičie IgG anti-ľudské CD63 protilátky, koncentrácia 0,5 mg/ml (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

- monoklonálne myšie IgG anti-CAI; koncentrácia 1 mg/ml (ORIGENE, Rockville, Maryland, USA)
- Riedenie primárnych protilátok: v pomere 1:1000 v blokačnom roztoku s PBS-T o pH 7,4

Sekundárne protilátky (konjugát):

- anti-myšie IgG-HRP, koncentrácia 1 mg/ml (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO. USA)
- anti-kráľičie IgG-HRP, koncentrácia 1 mg/ml (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO. USA)

Použitá membrána a zariadenie:

- Nitrocelulózoová membrána, Ø 0,2 µm (LKB, Bromma, Švajčiarsko)
- Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)

Použitý roztok:

- Premývací roztok: PBS-T pH 7,4: (8g NaCl; 0,2 g KCl; 0,2 g KH₂PO₄; 2,9 g Na₂HPO₄·12 H₂O; doplnené na objem 1 liter dH₂O + 4 ml 25% Tween 20)
- Blokovací roztok: 2,5 g odtučnené sušené mlieko rozpustené v 50 ml PBS-T
- Riediaci roztok pre primárnu Ab a konjugát vid' blokovací roztok
- Transférový roztok (Towbin): 3,02 g Tris, 14,4 g glycin, rozpustené v 200 ml methanolu + 800 ml dH₂O
- Enzýmový substrát: Clarity™ Western ECL Substrate, 3 ml/membránku (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)

Postup:

Membrána, filtračné papiere a gél s rozdelenými proteínmi metódou SDS-PAGE boli najprv namočené v transférovom roztoku Towbin po dobu minimálne 10 min. Následne sa zostavila aparatúra pre proteínový blotting: na zmočený filtračný papier sa umiestnila nitrocelulózoová membrána tak aby sa nevytvorili vzduchové bubliny, ktoré by mohli ovplyvniť transfér. Potom sa na povrch membrány umiestnil gél, na ktorý sa opäť priložil filtračný papier. Aparatúra sa uzatvorila vekom a pripojila sa ku zdroju. Nastavilo sa konštantné napätie 12 V a prúd 300 mA/membránu. Celková doba blottingu proteínov z gélu na membránu trvala 60 min.

Po skočení sa aparatúra odpojila od zdroja a membrána sa ponorila do blokovacieho roztoku a nechala sa inkubovať 60 min pri RT na rotátore. Po blokovacom kroku nasledovala inkubácia membrány s primárnou protilátkou nariadenou v pomere 1:1000 v blokovacom roztoku s PBS-

T o pH 7,4 pri RT na rotátore po dobu 60 min. Potom sa membrána premyla 4 krát v PBS-T o pH 7,4 v 5 min intervaloch pri RT na rotátore. Napokon sa membrána nechala inkubovať s konjugátom nariadeným v pomere 1:10 000 v blokovacom roztoku s PBS-T o pH 7,4 pri RT na rotátore po dobu 60 min. Membrána sa opäť premyla v PBS-T o pH 7,4 šesťkrát po 5 min intervaloch pri RT na rotátore. Po premytí sa na membránu aplikoval enzymatický substrátový roztok a nechal sa pôsobiť 5 min pri RT.

4.3.1 Opätovné naviazanie sekundárnych protilátok („rebinding“) pre overenie nešpecifickej skríženej reakcie

Použité roztoky:

- „Stripping“ pufer: 100 mM glycín – HCl; pH 2,6 (0,3754 g glycínu rozpustené v 50 ml dH₂O)
- Premývací roztok: PBS-T pH 7,4
- Blokovací a riediaci roztok pre konjugát: vid' metóda Western blot

Použité protilátky:

- Sekundárne anti-králičie IgG-HRP protilátky, koncentrácia 1 mg/ml (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO. USA)

Postup:

Na nitrocelulóзовú membránu s naviazanými primárnymi aj sekundárnymi protilátkami sa aplikoval „stripping“ pufer pre narušenie väzby Ag-Ab a tým odstránenie týchto protilátok z membrány. Po 30 min inkubácii v „stripping“ pufre pri RT na rotátore sa membrána premyla dvakrát po 10 min v PBS-T pufri o pH 7,4. Membrána sa nechala 2 hod blokovať v blokovacom roztoku pri RT na rotátore. Opätovne sa na membránu aplikoval konjugát anti-králičie IgG-HRP riedené 1:10 000 v blokovacom roztoku s PBS-T o pH 7,4 pri RT na rotátore 60 min. Membrána sa opäť premyla v PBS-T o pH 7,4 šesťkrát po dobu 5 min pri RT na rotátore. Po premytí sa na membránu aplikoval enzymatický substrátový roztok a nechal sa pôsobiť 5 min pri RT.

4.4 Dot blot analýza

Použité roztoky:

- PBS-T pufer (pH=7,4; s 0,1% Tween)
- Ekvilibračný a premývací roztok: PBS-T (pH 7,4; 0,1% Tween)
- Blokovací roztok: 5% BSA (suš. mlieko) v PBS-T (2,5g BSA v 50 ml PBS-T)

- Roztok na riedenie primárnych Ab a konjugátu: vid' blokovací roztok
- Enzýmový substrát: Clarity™ Western ECL Substrate, 200 µl/membránu (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Negatívna kontrola:
 - 1% hovädzí sérový albumín, BSA; (čistota ≥ 96 %); (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
 - PBS-T o pH 7,4

Použitá membrána a zariadenie:

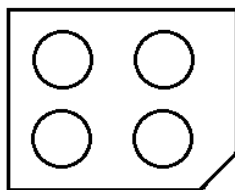
- Immun-Blot PVDF membrána pre blotting proteínov, Ø 0,2 µm (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Dot-blot zariadenie, 96 units, Ø 3 mm (SciePlast Ltd., Cambridge, UK)

Použité protilátky:

- Primárne monoklonálne myšie IgG anti-CAI protilátky; množstvo 50 µg / 1 mg nosiča; koncentrácia 1 mg/ml (ORIGENE, Rockville, Maryland, USA)
- Primárne monoklonálne myšie IgG1 anti-ľudské CD81 protilátky, TAPA-1, 26 kDa, klon 5A6, koncentrácia 0,5 mg/ml (BioLegend Inc, San Diego, CA, USA)
- Primárne monoklonálne myšie IgG1 anti-ľudské CD63 protilátky, LEAF™, 53 kDa, klon H5C6, koncentrácia 1 mg/ml (BioLegend Inc, San Diego, CA, USA)
- Primárne polyklonálne králičie IgG anti-ľudské CD63 protilátky, koncentrácia 0,5 mg/ml (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
- Sekundárne anti-myšie IgG-HRP protilátky, koncentrácia 1 mg/ml (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO. USA)
- Sekundárne anti-králičie IgG-HRP protilátky, koncentrácia 1 mg/ml (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO. USA)

Postup:

Na začiatku PVDF membrána bola namočená v 100% methanole po dobu 10 min. potom sa membrána urýchlene preniesla na aparatúru pripojenú na vakuum. Následne prebehla ekvilibrácia membrány PBS-T o objeme 100 µl/jamku. Potom sa nadávkovala nariedená vzorka (2,5 µl vzorky + 97,5 µl ddH₂O). Membrána sa opäť premyla dvakrát 100 µl PBS-T pufrom o pH 7,4 na jamku. Po premytí sa membrána vybrala z aparatúry a nechala sa voľne uschnúť a nastrihala sa na menšie membránky podľa šablóny na základe počtu vzoriek (vid' schéma).



Jednotlivé membránky sa ponorili do blokovacieho roztoku na 60 min pri RT za stáleho trepania. Potom sa membránky rýchlo premyli trikrát 1 ml PBS-T pufru o pH 7,4. Následne sa aplikovala primárna protilátka nariedená v pomere 1:1000 (1:5000 alebo 1:10 000) blokovacím roztokom. Prebehla inkubácia pri RT za stáleho trepania po dobu 60 min. Membránky sa rýchlo premyli trikrát 1 ml PBS-T pufru a následne opäť v 5 min intervaloch v 1 ml PBS-T o pH 7,4. Potom sa aplikovali na membránky špecifické značené anti-králičie alebo anti-myšie IgG-HRP sekundárne protilátky nariedené v pomere 1:10 000 blokovacím roztokom. Nasledovala 60 min inkubácia pri RT za stáleho trepania. Po inkubácii sa membránky rýchlo premyli trikrát 1 ml PBS-T pufru a opätovne trikrát v 5 min intervaloch 1 ml PBS-T pufru o pH 7,4. Nakoniec sa aplikoval enzýmový substrát 100 µl/membránku a nechal sa pôsobiť 5 min.

4.5 Izolácia exozómov z ľudského séra komerčnými testami

Použité roztoky:

- mirCURY™ Exosome Isolation Kit pre sérum / plazmu; na báze imunoprecipitácie; pre objem 600 µl ľudského séra (Exiqon-Qiagen, Hilden, Nemecko) (viď postup A)
 - komerčný Precipitačný roztok A
 - komerčný Resuspendačný roztok
- Total Exosome Isolation Kit pre sérum; na báze imunoprecipitácie; pre objem 150 µl ľudského séra (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) (viď postup B)
 - Komerčný precipitačný roztok
- Premývací roztok: PBS o pH 7,4

Postup A:

Sérum o objeme 600 µl sa scentrifigovalo pri 12,3 rpm po dobu 5 min pri RT na odstránenie zvyškov buniek. Supernatant o objeme 500 µl sa preniesol do novej skúmavky, časť sa uchovala ako PV. K supernatantu sa pridalo 200 µl Precipitačného pufru A s následnou inkubáciou na rotátore pri 4 °C po dobu 60 min. Následne prebehla centrifugácia pri 5,0 rpm. Odoberal sa supernatant do novej skúmavky (S1). Usadenina (peletka) na dne skúmavky sa resuspendovala

pomocou komerčného resuspendačného pufru o objeme 270 μ l. Suspenzia sa pretrepala na vortexe po dobu 5 až 10 min do homogenizácie roztoku (S2). Jednotlivé frakcie sa uschovali pre overenie účinnosti izolácie na SDS-PAGE s následným blottingom na membránu.

Postup B:

Sérum o objeme 150 μ l sa scentrifigovalo pri 6,0 rpm po dobu 30 min pri RT na odstránenie buniek a ich zvyškov. Odobral sa supernatant o objeme 100 μ l (S1), časť sa uschovala ako PV. K supernatantu sa pridal komerčný precipitačný roztok o objeme 20 μ l/100 μ l séra. Prebehla inkubácia pri 4 °C na rotátore po dobu 30 min. Následne sa suspenzia scentrifigovala pri 12,3 rpm po dobu 10 min a pri RT. Potom sa odobral supernatant (S2), predpokladaná vyizolovaná frakcia exozómov ostala v peletke na dne skúmavky, ktorá sa resuspendovala v 25 μ l PBS pufru o pH 7,4. Všetky frakcie vrátane vyizolovaných exozómov sa použili pre ďalšiu SDS-PAGE analýzu s prípadným následným blottingom na membránu metódou WB.

4.6 Príprava imunosorbentu

4.6.1 2-kroková imobilizácia protilátok na magnetické častice

Použité chemikálie:

- hydrát kyseliny 2-morfolino-ethansulfonovej, MES (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO. USA)
- hydroxy-2,5-dioxo-pyrrolidin-3-sulfonová kyselina, SULFO-NHS (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO. USA)
- N-(3-dimethylaminopropyl)-N-ethylkarbodiimid hydrochlorid, EDC (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO. USA)

Použité roztoky:

- 0,1 M MES pufer o pH 5,0 (1,9524g/100 ml; úprava pH pomocou 6 M NaOH)
- PBS pufer o pH 7,4 (4 g NaCl; 0,1 g KH₂PO₄; 1,45g Na₂HPO₄ x 12 H₂O; 0,1 g KCl; doplnené na objem 500 ml dH₂O)

Použité magnetické častice – imunosorbent:

- Sera-Mag Speed Beads, magnetické častice s karboxylovou funkčnou skupinou; Ø 0,816 μ m; množstvo 1 mg; koncentrácia 50 mg/ml; (Thermo Scientific Inc, Fremont, CA, USA)

Použité protilátky:

- Monoklonálne myšie IgG anti-CAI protilátky; množstvo 50 µg/1 mg nosiča; koncentrácia 1 mg/ml (ORIGENE, Rockville, Maryland, USA)
- monoklonálne myšie IgG1 anti-ľudské CD63 protilátky, LEAFTM, 53 kDa, klon H5C6, koncentrácia 1 mg/ml (BioLegend Inc, San Diego, CA, USA)
- polyklonálne králičie IgG anti-ľudské CD63 protilátky, koncentrácia 0,5 mg/ml (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

Postup:

Pre prípravu magnetického nosiča sa použil 1 mg suspenzie magnetických častíc (50 µl sa odobralo zo zásobného roztoku o koncentrácii 1 mg/ml), ktoré sa následne 5- krát 1,5 ml 0,1 M MES pufru o pH 5,0. k premytým časticiam sa pridala zmes Sulfo-NHS (0,1 mg/250 µl 0,1 MES o pH 5,0) s EDC (0,6 mg/250 µl 0,1 MES o pH 5,0) o finálnom objeme 500 µl. Zmes spolu s magnetickými časticami sa nechala inkubovať 30 min na rotátore pri RT. Častice sa opäť premyli dvakrát 1,5 ml 0,1 M MES pufru o pH 5,0. K preaktivovaným časticiam sa napokon pridali špecifické mono- / polyklonálne protilátky o množstve 50 µg/1 ml 0,1 M MES pufru o pH 5,0. Z roztoku protilátok sa odobralo a uschovalo 10 µl ako pôvodná vzorka (PV) pre overenie účinnosti väzby metódou SDS-PAGE. Nasledovala inkubácia cez noc v chladničke pri 4°C na rotátore. Na druhý deň pomocou magnetického separátoru sa odobral supernatant ako väzbová frakcia (VF). Častice sa premyli trikrát 1,5 ml 0,1 M MES pufru o pH 5,0. Následne sa opäť premyli štyrikrátštyrikrát 1,5 ml PBS pufrom o pH 7,4. Po každom prvom premytí sa odoberala premývacia frakcia (P) pre SDS-PAGE analýzu. Výsledný nosič sa uschoval v 1 ml PBS o výslednej koncentrácii 1mg/ml.

4.6.2 Imobilizácia protilátok na nosič s proteínom A/G s následným zosieťovaním (cross-linking) použitím DMP

Použité chemikálie:

- Imidoester dimethyl pimelimidate, DMP; C₉H₁₈N₂O₂ (Thermo-Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- Trifluor octová kyselina, TFA; 0,05% (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO. USA)
- Triethanolamín; 98%; C₆H₁₅NO₃ (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO. USA)
- Ethanolamín; C₂H₇NO (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO. USA)
- Močovina; CH₄N₂O; (Lach:ner, Neratovice, CZ)

Použité roztoky:

- Väzbový roztok a premývacie roztok: 0,1 M MES pH 5,0

- Zosieťovanie:
 - premyvací roztok: PBS pH 7,4 s 0,1 % Tweenom (PBS-T)
 - zosieťovací roztok: 0,2M triethanolamín v PBS-T, pH 8,0
 - blokovací roztok: 50 mM ethanolamín v PBS-T

Použitie magnetické častice – imunosorbent:

- BcMagTM Protein G, magnetické častice kovalentne konjugované s rekombinantným proteínom G na povrchu, Ø 1 µm, 20 mg/ml, množstvo 1 mg (Bioclone Inc, San Diego, CA, USA)
- BcMagTM Protein A, magnetické častice kovalentne konjugované s rekombinantným proteínom A na povrchu, Ø 1 µm, 20 mg/ml, množstvo 1 mg (Bioclone Inc, San Diego, CA, USA)

Použitie protilátky:

- monoklonálne myšie IgG1 anti-ľudské CD63 protilátky, LEAFTM, 53 kDa, klon H5C6, koncentrácia 1 mg/ml (BioLegend Inc, San Diego, CA, USA)
- polyklonálne králičie IgG anti-ľudské CD63 protilátky, koncentrácia 0,5 mg/ml (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
- monoklonálne myšie IgG anti-CAI; koncentrácia 1 mg/ml (ORIGENE, Rockville, Maryland, USA)

Postup:

Na prípravu nosiča sa použilo 1 mg magnetických častíc (odoberalo sa 20 µl zo zásobného roztoku, koncentrácia 1 mg/ml), ktoré sa resuspendovali v uskladňovacom roztoku na vortexe a následne sa pomocou magnetického separátora tento pufer odstránil. Potom sa častice premyli dvakrát v 50 µl 0,05% TFA a ďalej sa trikrát premyli v 1 ml MES pufru o pH 5,0. K premytým časticiam boli pridané nariedené protilátky v MES pufru o celkovom objeme 200 µl (50 µl Ab doplnené na objem 200 µl s MES pufrom o pH 5,0). Časť protilátok uschovala ako PV. Nasledovala 60 min inkubácia pri RT na rotátore. Pomocou separátora sa odobral supernatant ako väzbová frakcia (VF). Ďalej sa častice premyli trikrát v MES pufrí o pH 5,0 a napokon v 1 ml zosieťovacieho roztoku 0,2 M ethanolamínu o pH 8,0. Po odsatí sa opätovne pridal 1 ml 0,2 M ethanolamínu s obsahom 25 mM DMP (crosslinker). Prebehla inkubácia pri RT na rotátore po dobu 45 min. Následne sa odobrala frakcia a častice sa premyli v 1 ml blokovacieho pufru 50 mM ethanolamínu, ktorý sa odsal a opätovne sa pridal znova 1 ml na konečnú koncentráciu 1 mg/ml. Nasledovala inkubácia pri RT na rotátore po dobu 60 min. Po odobratí

frakcie sa častice ešte trikrát premyli v PBS-T o pH 7,4. Po každom prvom premytí sa odobrala frakcia pre ďalšiu analýzu na overenie účinnosti väzby metódou SDS-PAGE.

4.7 Overenie účinnosti imunosorbentu vychytaním antigénu – vyizolovanej frakcie exozómov z ľudského séra

Použité chemikálie:

- Imunosorbent: magnetické častice BcMag Protein G a Sera-Mag s imobilizovanými primárnymi monoklonálnymi myšimi anti-CAI a polyklonálnymi králičími anti-CD63 protilátkami (50 µg protilátok na 1mg nosiča)
- Antigény (Ag):
 - Karbonická anhydráza I (CAI): množstvo 50 µg rozpustené v 1 ml PBS-T o pH 7,4; koncentrácia zásobného roztoku 1 mg/ml; pre záchyt sa použilo 200 µl suspenzie Ag
 - Vyizolovaná frakcia exozómov: 25µl frakcie nariedené na celkový objem 1 ml s PBS-T o pH 7,4; pre záchyt sa použilo 200 µl suspenzie Ag

Použité roztoky:

- Riediaci a premývací roztok: PBS-T a PBS-T s obsahom 1M NaCl
- Elučný roztok: 0,05% TFA o pH 2-3

Postup:

K vopred pripravenému imunosorbentu (postup prípravy vid' predtým) o koncentrácii 1 mg/ml v PBS-T o pH 7,4 sa pridalo 200 µl pripravenej suspenzie Ag (pri CAI 50 µl/ml PBS-T; pri exozomálnej frakcii 25 µl/ml PBS-T). Časť suspenzie Ag sa uschovalo pre SDS-PAGE analýzu ako pôvodná vzorka (PV). Väzba Ag prebiehala počas 60 min inkubácie na rotátore pri RT. Po skončení inkubácie sa odobrala väzbová frakcia (VF) pre ďalšiu analýzu. Následne sa imunosorbent premyl trikrát v 1 ml PBS-T o pH 7,4. Po prvom premytí sa odobrala premývacia frakcia (P1). Potom sa premyl dvakrát v 1 ml PBS-T s obsahom 1M NaCl. Opäť sa odobrala premývacia frakcia (P2). Napokon sa imunosorbent premyl ešte trikrát v 1 ml PBS-T o pH 7,4 a opätovne sa odobrala frakcia P3. Po premytí nasledovala elúcia Ag dvakrát v 150 µl 0,05% TFA po dobu 10 min pri RT na rotátore. Po každej elúcii sa odobrala frakcia (E1 a E2).

4.8 Deplécia ľudského sérového albumínu

Použité magnetické častice:

- Komerčný imunoprecipitačný kit PureProteome™ Albumin Magnetic Beads MILLIPORE, magnetické častice s kovalentne naviazaným anti-albumínovým ligandom; množstvo 3ml suspenzie odpovedalo 600 µl častíc; kit bol optimalizovaný pre 100 µl ľudského séra (Merck KGaA, Darmstadt, Nemecko)

Použité roztoky:

- Premývací a riediaci pufer: PBS o pH 7,4
- Elučný roztok: glycín-HCl o pH 2,0

Postup:

Suspenzia magnetických častíc o objeme 3ml sa resuspendovali na vortexe v uskladňovacom pufre, ktorý sa napokon odobral pomocou magnetického separátoru. Častice sa premyli dvakrát v 1 ml PBS pufru o pH 7,4. Po odstránení PBS pufru sa k časticiam pridala vzorka séra (100 µl séra nariadené na celkový objem 400 µl s PBS pufrom o pH 7,4). Časť séra sa uschovalo ako PV. Prebehla inkubácia pri RT na rotátore po dobu 60 min. Depletované sérum sa odobralo pomocou separátoru pre následnú izoláciu exozómov (S1). Častice sa premyli trikrát v 3 ml PBS pufru o pH 7,4. Po prvom premytí sa odobrala frakcia (P1). Nasledovala elúcia ľudského sérového albumínu (HSA) z magnetických častíc pomocou 500 µl elučného roztoku glycín- HCl o pH 2,0. Elučné frakcie sa uschovali pre overenie deplécie HSA zo séra (E1-E7) metódou SDS-PAGE.

4.9 Proteolytické štiepenie z gélu (In Gel Digest) modifikovaným trypsínom

Použité chemikálie:

- 2-jodoacetamid, IAC (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO. USA)
- Dithiotreitol, DTT (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO. USA)
- Hydrogénuhličitan amónny, NH_4HCO_3 (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO. USA)
- Kyselina trifluoroctová 99%, TFA (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO. USA)
- Acetonitril 100%, ACN (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO. USA)
- Kyselina mravčia, FA, HCOOH (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO. USA)
- Modifikovaný Trypsín pre sekvenáciu/Lys-C Mix, Mass Spec Grans, aktivita: 19136 U / mg (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA)

Použité roztoky:

- Roztok ABC: 100 mM NH_4HCO_3

- 10 mM DDT v 100 mM ABC
- 55 mM IAC v 100 mM ABC
- Premývací roztok: 100% ACN
- Odfarbovací roztok: 50% ACN/50 mM ABC
- Extrakčný roztok: 60% ACN/2% FA
- Roztok trypsínu: 10 ng/μl rozpustené v 10 mM ABC s obsahom 10% ACN

Použitá Matrica:

CHCA (koncentrácia 5 mg/ml rozpustená v 60% ACN s 0,1% TFA a 2 mM DAHC)

Postup:

Po predchádzajúcom rozdelení proteínov metódou SDS-PAGE sa príslušné prúžky proteínov vyrezali z polyakrylamidového gélu ofarbeného Commasie brilliant blue a preniesli sa do skúmavky. Následne sa pomocou špičky kúsok gélu rozmelnili na menšie čiastočky. Ku gélu sa pridalo 100 μl odfarbovacieho roztoku a nasledovala 30 min inkubácia pri RT pokým nedošlo k úplnému odfarbeniu gélu. Potom sa ku gélu pridalo 400 μl 100% ACN a zmes sa nechala inkubovať pri RT až kým roztok nezbelel a následne sa roztok ACN odsal. K vzorke sa pridalo 50 μl 10 mM DTT a prebehla ďalšia inkubácia v termomixéri pri teplote 60 °C po dobu 30 min. Opäť sa k roztoku pridalo 400 μl 100% ACN a roztok sa nechal inkubovať pri RT až do zbelenia. Po odsatí roztoku sa pridalo 50 μl 55 mM IAC a zmes sa nechala inkubovať v tme pri RT. Vzorka sa premyla v 100 μl roztoku ABC a následne v 400 μl ACN. K takto pripravenému gélu sa pridalo 50 μl roztoku trypsínu o koncentrácii 10 ng / μl v 10 mM NH₄HCO₃ s 10% ACN. Nasledovala inkubácia v chladničke pri teplote 4 °C po dobu 30 min z dôvodu nasatia trypsínu do gélu. Ak by nebol gél ponorený do roztoku pridalo by sa ďalšie množstvo trypsínu a nasledovala by inkubácia po dobu 45 min v chladničke. Pokiaľ bol gél ponorený do roztoku nasledovala už len 20 min inkubácia v chladničke a následne sa pridalo 10 μl 100 mM ABC s inkubáciou cez noc v termobloku s trepaním 500 rpm pri 37 °C po dobu 18 hodín. Po naštepení bol odobratý supernatant a okyslený s 5% TFA na výslednú hodnotu pH 3 – 4. K zbytkovému gélu sa pridalo 50 μl extrakčného roztoku a nasledovala inkubácia pri 37 °C na rotátore s 500 rpm po dobu 15 min. Extrahované peptidy a supernatant boli vysušené pri teplote 45 °C a 1400 rpm. Následne boli rozpustené v 20 μl 0,1% TFA. Takto upravené vzorky boli pripravené k hmotnostnej analýze. Vzorky peptidov boli pred analýzou skladované pri teplote -20 °C.

5 Výsledky a diskusia

Diplomová práca bola zameraná na zavedenie metódy izolácie exozómov, pomocou ktorej by bolo možné detegovať EVs z ľudskej krvi. Systém bol založený na kombinácii imunoanalýzy magnetickej separácie na báze imunoprecipitácie a imunochemickej detekcie. Podstatou týchto metód, ako už bolo bližšie uvedené v teoretickej časti, bola reakcia špecifickej protilátky s príslušným antigénom. V tejto práci sme sa sústredili na metódy izolácie komerčnými testami a v laboratoriu pripraveným imunosorbentom s imobilizovanými špecifickými protilátkami namierenými proti povrchovým CD znakom na exozómoch. Všetky experimenty a funkčnosť vyvíjanej metódy sa spočiatku testovala na modelovom systéme. Neskôr po potvrdení funkčnosti modelového systému sa prešlo k experimentom so vzorkami séra od zdravého jedinca.

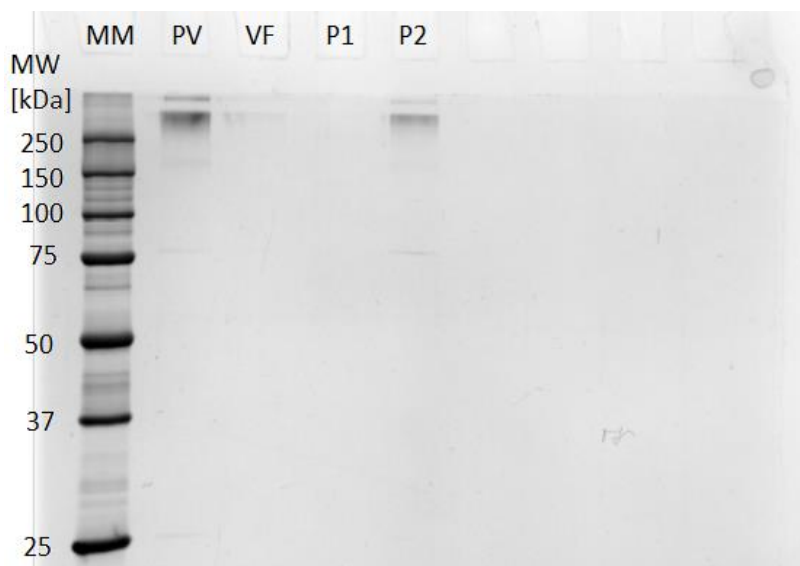
5.1 Výber vhodného magnetického nosiča pre prípravu imunosorbentu

Jednou z metód izolácie exozómov sú imunoafinitné metódy ako napríklad príprava imonosorbentu, kde sa na vhodne zvolený magnetický nosič imobilizujú spočiatku modelové nešpecifické anti-ľudské IgG protilátky. V experimente sa porovnávali tri komerčné magnetické častice vid' *Tabuľka 2*. SeraMag častice mali priemer 0,816 μm s karboxylovou funkčnou skupinou. Na aktiváciu povrchu týchto častíc sa použila karbodiimidová metóda, postup je uvedený v kapitole 4.6.1, s 0,6 mg EDC a 0,1 mg Sulfo-NHS na 1mg magnetických častíc. Komerčné častice BcMag s proteínom G alebo A na svojom povrchu mali priemer 1 μm . Pre imobilizáciu modelových protilátok, sa DMP použil na ich zosieťovanie („cross-linker“) a ethanolamín ako konečný blokátor tejto reakcie, kde postup prevedenia tejto metódy je detailnejšie uvedený v kapitole 4.6.2.

Tabuľka 2: Komerčné magnetické častice použité pre prípravu imunosorbentu

Magnetické častice	Funkčná skupina	Výrobca	Priemer r [μm]	Aktivácia	Spôsob väzby	Použitá množstvo	Obrázok gélu
SeraMag	-COOH	Thermo Scientific	0,816	EDC, Sulfo-NHS	neorientovaná	1 mg	14
BcMag	Protein G	Bioclone	1	DMP	orientovaná	1 mg	15
BcMag	Protein A	Bioclone	1	DMP	orientovaná	1 mg	16

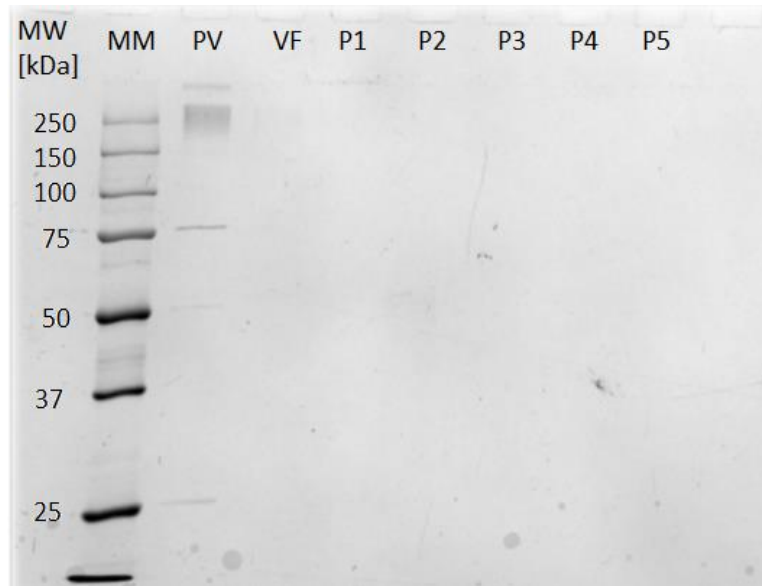
Po neorientovanej väzbe 50 μg nešpecifických anti-ľudských IgG na 1 mg magnetického SeraMag nosiča v prostredí MES pufru o pH 5,0 sa po 1 hodinovej inkubácii odobrala väzbová frakcia a podobne tomu tak bolo aj u premývacích frakciách v PBS-T o pH 7,4. Všetky jednotlivé frakcie sa pre overenie účinnosti väzby metódou SDS-PAGE nadávkovali v pomere 10 μl vzoriek ku 10 μl vzorkového pufru G do jamiek 10% polyakrylamidového gélu ako je uvedené na *Obrázku 14*. Po rozdelení proteínov sa gél ofarbil koloidným roztokom amoniakálneho striebra, postup farbenia je bližšie uvedený v kapitole 4.2.1. Na základe denzitometrického vyhodnotenia intenzity v programe Image Lab 5.0 po vyvolaní v prístroji ChemiDoc sa určilo, že sa 50,74 % protilátok naviazalo na magnetický nosič. Určitá časť protilátok sa nenaviazala už pri väzbe a časť sa uvoľnilo pri premývaní v PBS-T pufré o pH 7,4, čo mohlo byť zapríčinené rozdielom pH pri prechode z väzbového MES pufru o pH 5,0 medzi prvým a druhým premývaním.



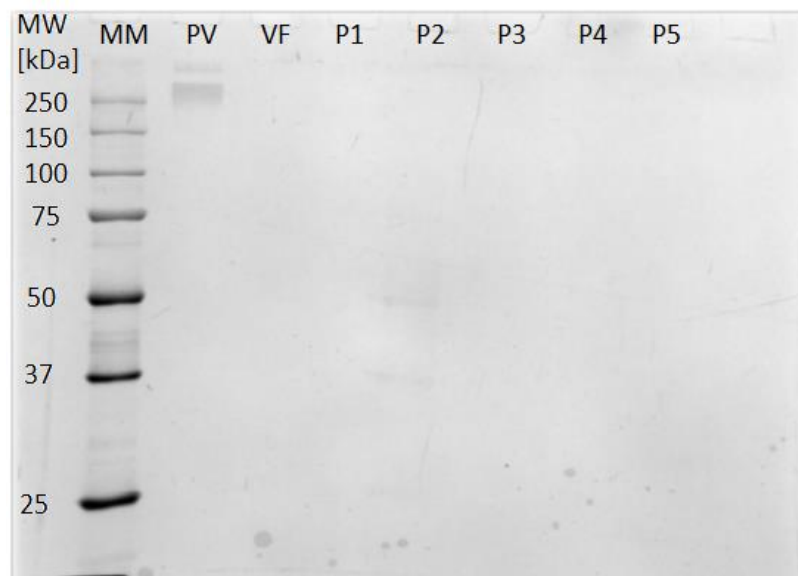
Obrázok 13: Výsledok SDS-PAGE analýzy pre overenie účinnosti nosiča-SeraMag pre imobilizáciu nešpecifických protilátok anti-ľudských IgG; 10% polyakrylamidový gél, 5% zaostrovací gél, vzorkový pufer G; farbenie koloidným roztokom amoniakálneho striebra; MM (molekulový marker); PV (nešpecifické anti-ľudské IgG); VF (väzbová frakcia v MES pufru); P1 (premývanie v MES pufrí o pH 5,0) P2 (premývanie v PBS-T o pH 7,4)

Pri väzbe 50 μg nešpecifických anti-ľudských IgG v prostredí MES pufru o pH 5,0 na 1mg nosiču BcMag s Proteínom G a A sa jednalo o orientovaný typ väzby. Účinnosť väzby priátok sa overila metódou SDS-PAGE. Podobne ako u predchádzajúcom SeraMag nosiči sa taktiež odobrali jednotlivé frakcie pri väzbe ako aj pri premývaní či croslinkingu s DMP o pH 8,0. Opäť boli jednotlivé frakcie nadávkované v pomere 10 μl vzoriek ku 10 μl vzorkového pufru G do jamiek 10% polyakrylamidového gélu ako je uvedené na *Obrázku 15 - 16*. Na základe denzitometrického vyhodnotenia intenzity v programe Image Lab 5.0 po vyvolaní v prístroji

ChemiDoc sa určilo, že sa 100 % protilátok naviazalo na magnetický nosič v prípade BcMag Proteín G aj A.



Obrázok 14: Výsledok SDS-PAGE analýzy pre overenie účinnosti nosiča BcMag Proteín G pre imobilizáciu nešpecifických protilátok anti-ľudských IgG; 10% polyakrylamidový gél, 5% zaostrovač gél, vzorkový pufer G; farbenie koloidným roztokom amoniakálneho striebra; MM (molekulový marker); PV (nešpecifické anti-ľudské IgG); VF (väzbová frakcia v MES pufru); P1 (premyvanie v PBS- T o pH 7,4); P2 (zosieťovanie s ethanolamínom o pH 8,0); P3 (inkubácia v ethaolamíne s DMP); P4 (inkubácia v triethanolamíne); P5 (premyvanie v PBS-T o pH 7,4)



Obrázok 15: Výsledok SDS-PAGE analýzy pre overenie účinnosti nosiča BcMag Proteín A pre imobilizáciu nešpecifických protilátok anti-ľudských IgG; 10% polyakrylamidový gél, 5% zaostrovač gél, vzorkový pufer G; farbenie koloidným roztokom amoniakálneho striebra; MM (molekulový marker); PV (nešpecifické anti-ľudské IgG); VF (väzbová frakcia v MES pufru); P1 (premyvanie v PBS- T o pH 7,4); P2 (zosieťovanie s ethanolamínom o pH 8,0); P3 (inkubácia v ethaolamíne s DMP); P4 (inkubácia v triethanolamíne); P5 (premyvanie v PBS-T o pH 7,4)

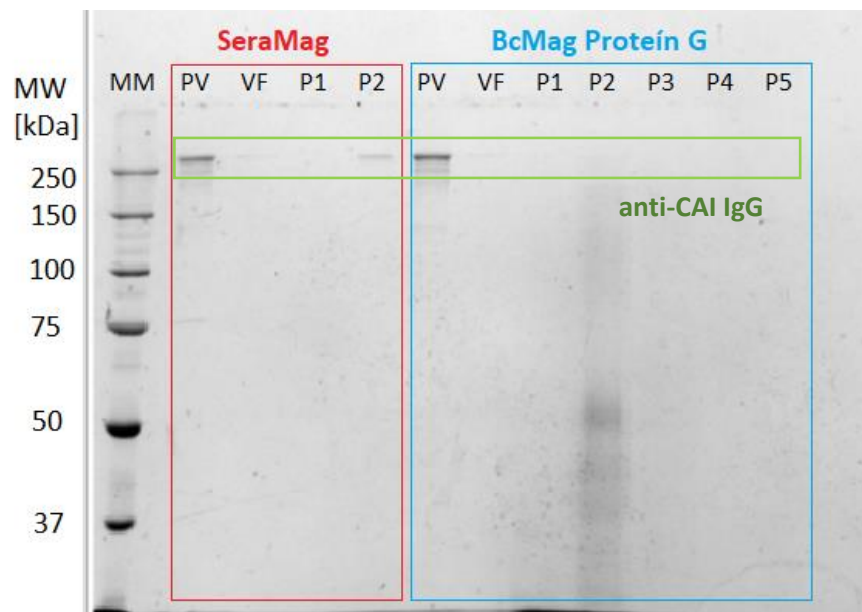
Na základe výsledkov denzitometrického vyhodnotenia gélov pre overenie účinnosti väzby modelových protilátok sa javia SeraMag aj BcMag Proteín G a A sľubne pre zostavu imunosorbentu. Ak sa vezmú do úvahy rozdiely afínít Proteínov G a A, vid' *Tabuľka 3*, voči jednotlivým triedam protilátok sa pre prípravu potenciálneho imunosorbentu zvolil ako nosič komerčné magnetické BcMag Proteín G častice.

Tabuľka 3: Prehľad afínít Proteínu A a G pre jednotlivé druhy a triedy protilátok. Prevzaté a modifikované z [156]

<i>Druh</i>	<i>Trieda protilátok</i>	<i>Proteín A</i>	<i>Proteín G</i>
<i>ľudské</i>	celkové IgG	+++	+++
	IgG1	+++	+++
	IgG2	+++	+++
	IgG3	+	+++
	IgG4	+++	+++
	IgM	+	-
	IgD	-	-
	IgA	+	-
<i>myšie</i>	celkové IgG	+++	+++
	IgM	-	-
	IgG1	+	++
	IgG2a	+++	+++
	IgG2b	+++	+++
	IgG3	+++	+++
<i>králičie</i>	celkové IgG	+++	+++

5.1.1 Príprava modelového imunosorbentu imobilizáciou špecifických protilátok na magnetické SeraMag a BcMag Proteín G nosiče

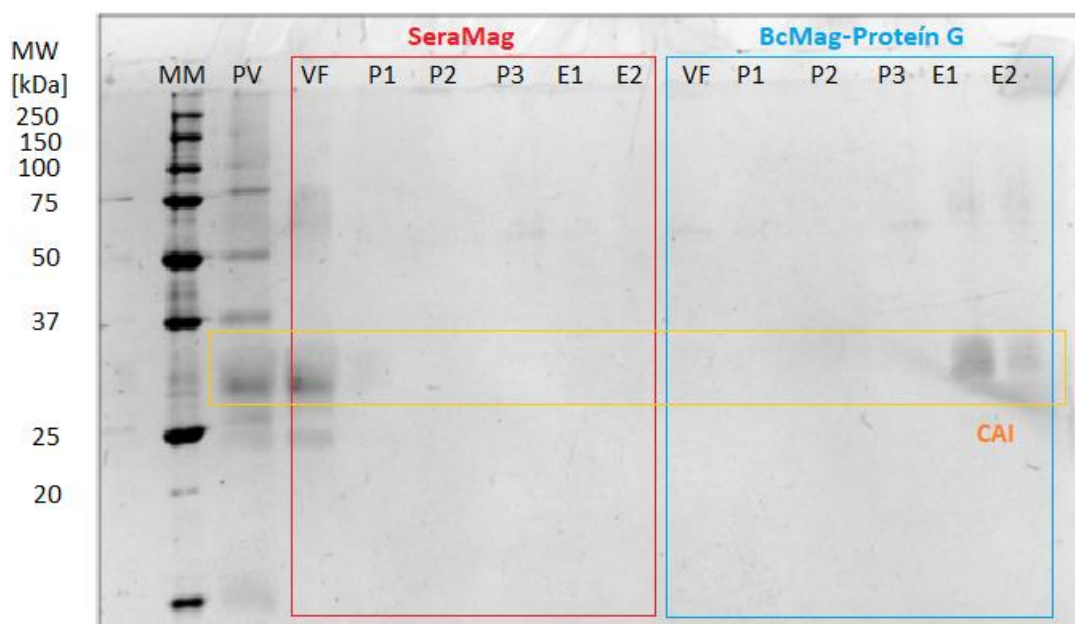
Po predchádzajúcej výbere nosičov sa pristúpilo k príprave modelového imunosorbentu zvolili už špecifické monoklonálne myšie anti-CAI IgG (ORIGENE). Ako magnetické nosiče sa po predošlej analýze zvolili SeraMag a BcMag Proteín G. Opäť sa viazalo 50 µg protilátok na 1 mg nosiča v prostredí MES pufru o pH 5,0. Postup imobilizácie aj podmienky boli rovnaké ako pri modelovom systéme s nešpecifickými anti-ľudskými IgG. Pre vyhodnotenie a porovnanie účinnosti väzby protilátok na nosiče sa použila metóda SDS-PAGE vid' *Obrázok 17*. Do jamiek gélu sa dávkovali vzorky v pomere 10 µl vzorky ku 10 µl vzorkového roztoku G. Po ofarbení gélu a denzitometrickom vyhodnotením sa určila v programe ImageLab 5.0 účinnosť väzby 75,26 % u nosiča SeraMag a 100% u BcMag Proteín G.



Obrázok 16: Výsledok SDS-PAGE analýzy pre porovnanie účinnosti nosičov SeraMag a BcMag Proteín G pre imobilizáciu špecifických monoklonálnych protilátok anti-CAI IgG. 10% polyakrylamidový gél, 5% zaostrovací gél, vzorkový pufer G; farbenie koloidným roztokom amoniakálneho striebra; MM (molekulový marker); SeraMag: PV (nešpecifické anti-ľudské IgG); VF (väzbová frakcia v MES pufru); P1 (premývanie v MES pufrí o pH 5,0) P2 (premývanie v PBS-T o pH 7,4) BcMag-Proteín G: PV (špecifické anti-CAI IgG); VF (väzbová frakcia v MES pufru); P1 (premývanie v PBS-T o pH 7,4); P2 (zosieťovanie s ethanolamínom o pH 8,0); P3 (inkubácia v ethaolamíne s DMP); P4 (inkubácia v triethanolamíne); P5 (premývanie v PBS-T o pH 7,4)

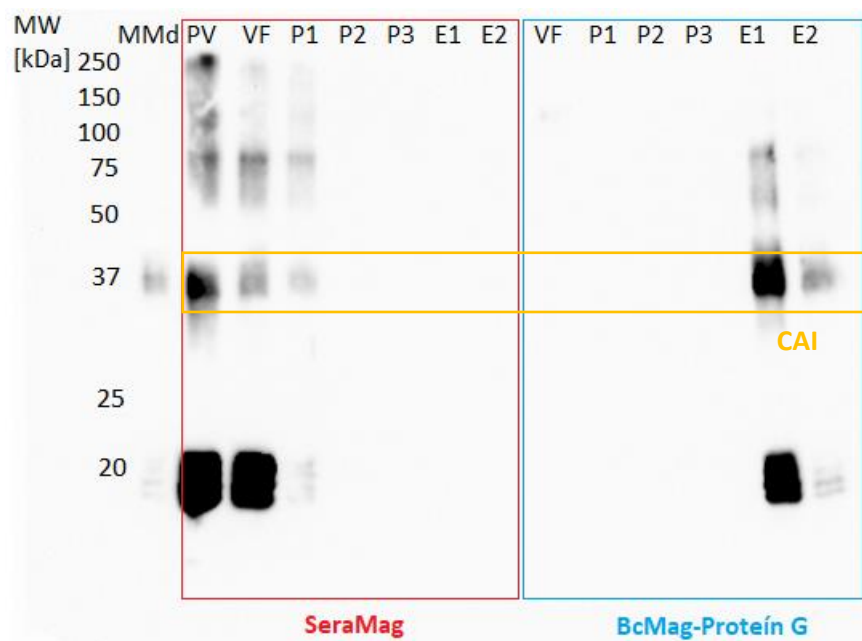
5.1.2 Overenie funkčnosti modelových imunosorbentov metódami SDS-PAGE a Semi-Dry Western blot

Po predchádzajúcej príprave imunosorbentov bolo nutné overiť ich funkčnosť princípom tvorby imunokomplexu väzbou proteínu karbonickej anhydrázy I (CAI) imobilizovanými monoklonálnymi myšími anti-CAI IgG (ORIGENE) na SeraMag a BcMag Proteín G nosičoch. Na väzbu sa použilo 50 µg CAI rozpustených v 1 ml PBS-T pufru o pH 7,4. K 1 mg pripraveného nosiča sa pridalo 200 µl suspenzie CAI, detailnejší postup je uvedený v kapitole 4.7. Po prebehnutí reakcie tvorby imunokomplexu sa odoberala väzbová frakcia ako aj po premývaní v PBS-T pufru o pH 7,4. Na overenie funkčnosti imunosorbentu elúciou CAI v prostredí elučného pufru 0,05% TFA sa použila metóda SDS-PAGE, kde sa do jamiek 16% polyakrylamidového gélu dávkovalo 7,5 µl vzorky + 7,5 µl vzorkového pufru G. Na gély, ktorý je uvedený na *Obrázku 18* možno vidieť, že pri imunosorbente so SeraMag časticami ako nosičom došlo k slabej tvorbe imunokomplexu a na základe denzitometrického vyhodnotenia v programe ImageLab 5.0 sa preukázalo, že 93,09 % CAI nebolo vyviazané a zvyšok sa uvoľnil počas premývania v PBS-T. Čo sa týka imunosorbentu s BcMag nosičom pravdepodobne došlo k celkovému vyviazaniu CAI pomocou 0,05% TFA sa eluovalo 85,78%.



Obrázok 17: Výsledok SDS-PAGE analýzy porovnania účinnosti imunosorbentov SeraMag a BcMag-Proteín G s imobilizovanými špecifickými monoklonálnymi anti-CAI IgG po väzbe CAI s následnou elúciou; 16% polyakrylamidový gél, 5% zaostrovací gél, vzorkový pufer G; farbenie koloidným roztokom amoniakálneho striebra; MM (molekulový marker); PV (pôvodná vzorka CAI); VF (väzba v MES pufrí o pH 7,4); P1 a P3 (premyvávanie v PBS-T o pH 7,4); P2 (premyvávanie v PBS-T o pH 7,4 s 1M NaCl); E1-E2 (elúcia CAI v 0,05% TFA)

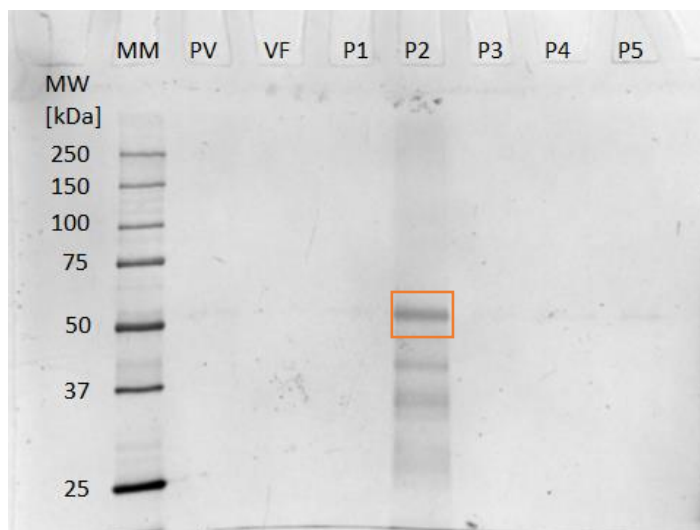
Pre ďalšie overenie funkčnosti imunosorbentov vyviazaním proteínov CAI a s ich následnou elúciou sa použilo preblotovanie proteínov na nitrocelulóзовú membránu metódou Semi-Dry WB, ktorej postup je uvedený v kapitole 4.3. Ako primárna protilátka slúžili opäť monoklonálne myšie anti-CAI IgG nariadené v pomere 1:1000 blokovacieho roztoku 5% sušeného mlieka. Ako sekundárne protilátky (konjugát) sa použili anti-myšie IgG značené chrenovou peroxidázou (HRP) (Sigma-Aldrich) riedené v pomere 1:10 000 blokovacieho roztoku 5% sušeného mlieka. Po aplikácii enzymatického substrátu sa membrána nechala vyvolať v stanici ChemiDoc, ako je uvedené na Obrázku 19. Na základe analýz SDS-PAGE a Semi-Dry WB sa ukázali magnetické častice BcMag Proteín G na rozdiel od SeraMag vhodnejšie pre prípravu modelového a potenciálneho imunosorbentu pre možnú izoláciu exozómov.



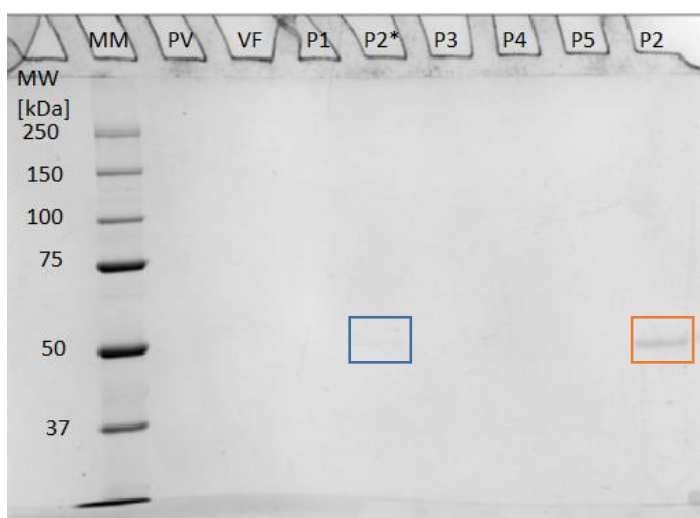
Obrázok 18: Výsledok analýzy WB pre porovnanie účinnosti imunosorbentov SeraMag a BcMag-Proteín G s imobilizovanými špecifickými monoklonálnymi anti-CAI IgG po väzbe CAI s následnou elúciou; 16% polyakrylamidový gél, 5% zaostrovací gél, vzorkový pufer G; riedenie prim. Ab 1:1000; riedenie konjugátu anti-myšie IgG-HRP 1:10 000; MMd (molekulový marker- dual color); PV (pôvodná vzorka CAI); VF (väzba v MES pufrí o pH 7,4); P1 a P3 (premytie v PBS-T o pH 7,4); P2 (premytie v PBS-T o pH 7,4 s 1M NaCl); E1-E2 (elúcia CAI v 0,05% TFA)

5.1.3 Optimalizácia podmienok prípravy imunosorbentu pri BcMag Proteín G nosiči

Na základe SDS-PAGE analýzy sme zistili, že sa nám objavuje prúžok v o molekulárnej veľkosti okolo 50 kDa pri imobilizácii protilátok na BcMag Proteín G magnetický nosič počas fáze zosieťovania s DMP. K tomuto javu dochádzalo pri prechode pH z 5,0 do 8,0. Pokus sa robil rovnakým postupom ako pri imobilizácii protilátok akurát s tým rozdielom, že sme namiesto protilátok použili MES pufer o pH 5,0. Jednotlivé vzorky sa nadávkovali na 12% polyakrylamidový gél nariadené v pomere 10 μ l vzorky ku 10 μ l vzorkového pufru G. Gél bol ofarbený koloidným roztokom amoniakálneho striebra vid' *Obrázok 20*. Ako možno vidieť na gély vo frakcii P2 došlo k uvoľneniu pravdepodobne hovädzieho sérového albumínu (Bovine Serum Albumin, BSA), ktorý je obsiahnutý v týchto komerčných magnetických časticiach. Pokúsili sme sa tento jav odstrániť vložением kroku do postupu premytím nosiča dvakrát s 50 μ l 0,05% TFA. Postup bol opäť rovnaký bez použitia protilátok a namiesto nich sa použil MES pufer o pH 5,0. Vzorky nariadené v pomere 10 μ l vzorky ku 10 μ l vzorkového pufru G sa nadávkovali na 10% polyakrylamidový gél. Do poslednej jamky sa vložila ešte frakcia P2 z minulej analýzy pre porovnanie účinnosti optimalizácie vid' *Obrázok 21*. Po rozdelení proteínov sa gél ofarbil koloidným roztokom amoniakálneho striebra.



Obrázok 19: Výsledok SDS-PAGE analýzy pre overenie stability nosiča BcMag Proteín G pri prechode pH z 5,0 do 8,0. 12% polyakrylamidový gél, 5% zaostrovací gél, vzorkový pufer G; farbenie koloidným roztokom amoniakálneho striebra; MM (molekulový marker); PV (MES pufer o pH 5,0); VF (väzbová frakcia v MES pufru); P1 (premyvávanie v PBS-T o pH 7,4); P2 (zosieťovanie s ethanolamínom o pH 8,0); P3 (inkubácia v ethanolamíne s DMP); P4 (inkubácia v triethanolamíne); P5 (premyvávanie v PBS-T o pH 7,4)



Obrázok 20: Výsledok SDS-PAGE analýzy pre overenie účinnosti optimalizácie premytia nosiča BcMag Proteín G premytím s 0,05% TFA. 10% polyakrylamidový gél, 5% zaostrovací gél, vzorkový pufer G; farbenie koloidným roztokom amoniakálneho striebra; MM (molekulový marker); PV (MES pufer o pH 5,0); VF (väzbová frakcia v MES pufru); P1 (premyvávanie v PBS-T o pH 7,4); P2* zosieťovanie s ethanolamínom o pH 8,0; P3 (inkubácia v ethanolamíne s DMP); P4 (inkubácia v triethanolamíne); P5 (premyvávanie v PBS-T o pH 7,4); P2 (zosieťovanie s ethanolamínom o pH 8,0 z pokusu bez premytia nosiča s TFA)

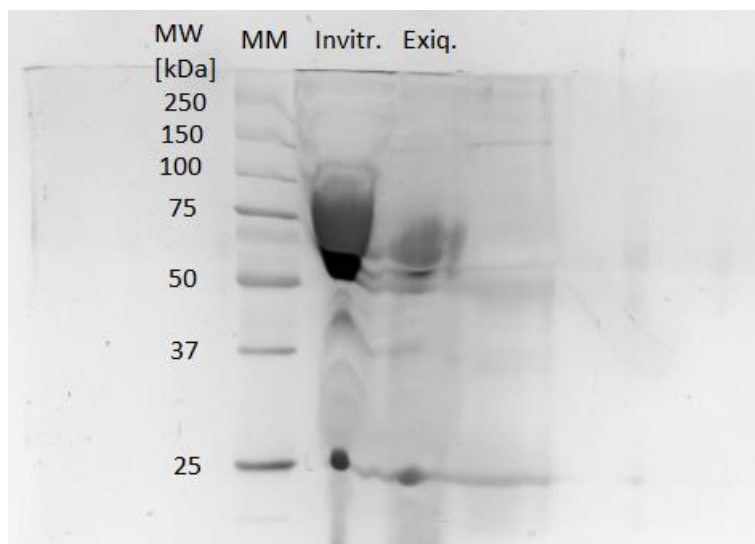
Z výsledku SDS-PAGE analýzy vidieť, že premytia nosiča na začiatku práce s ním 0,05% TFA má vplyv na uvoľňovanie BSA z nosiča pri prechode pH z 5,0 do 8,0 pri zosieťovaní s DMP. Prúžok s BSA vo frakcii P2* je podstatne slabší ako u P2 bez premytia nosiča 0,05% TFA.

5.2 Izolácia exozomálnej frakcie pomocou komerčných testov

Po vytvorení a optimalizovaní modelového systému prípravy imunosorbentu sa prišlo k testovaniu tohto systému na vzorkách séra získaného od zdravého darcu. Vzorky séra boli zmrazené a uschované pri teplote $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Na izoláciu exozomálnej frakcie zo séra sa použili dva komerčné testy mirCURY™ Exosome Isolation Kit (firma Exiqon) a Total Exosome Isolation Kit (firma Invitrogen). Princípom oboch testov je imunoprecipitácia. Na začiatku sa sérum zbavilo prebytočných buniek a ich zvyškov. Pri izolácii exozómov komerčným kitom od firmy Invitrogen sa použilo $600\text{ }\mu\text{l}$ séra, ktoré sa najskôr zbavilo zvyškov buniek centrifugáciou pri otáčkach $12,3\text{ rpm}$ podľa postupu (A) v kapitole 4.5. U kitu od firmy Invitrogen sa izolovalo zo $150\text{ }\mu\text{l}$ séra, ktoré bolo zbavené zvyškov buniek pri otáčkach $6,0\text{ rpm}$, postup (B) je bližšie uvedený kapitole 4.5. Odobral sa supernatant, v ktorom pokračovala izolácia exozómov. Vyizolovaná exozomálna frakcia v peletke na dne skúmavky sa resuspendovala v $270\text{ }\mu\text{l}$ resuspendačného pufru pri použití kitu od firmy Exiqon a v $25\text{ }\mu\text{l}$ PBS pufru o pH 7,4.

5.2.1 Porovnanie komerčných testov pre izoláciu exozomálnej frakcie metódou SDS-PAGE

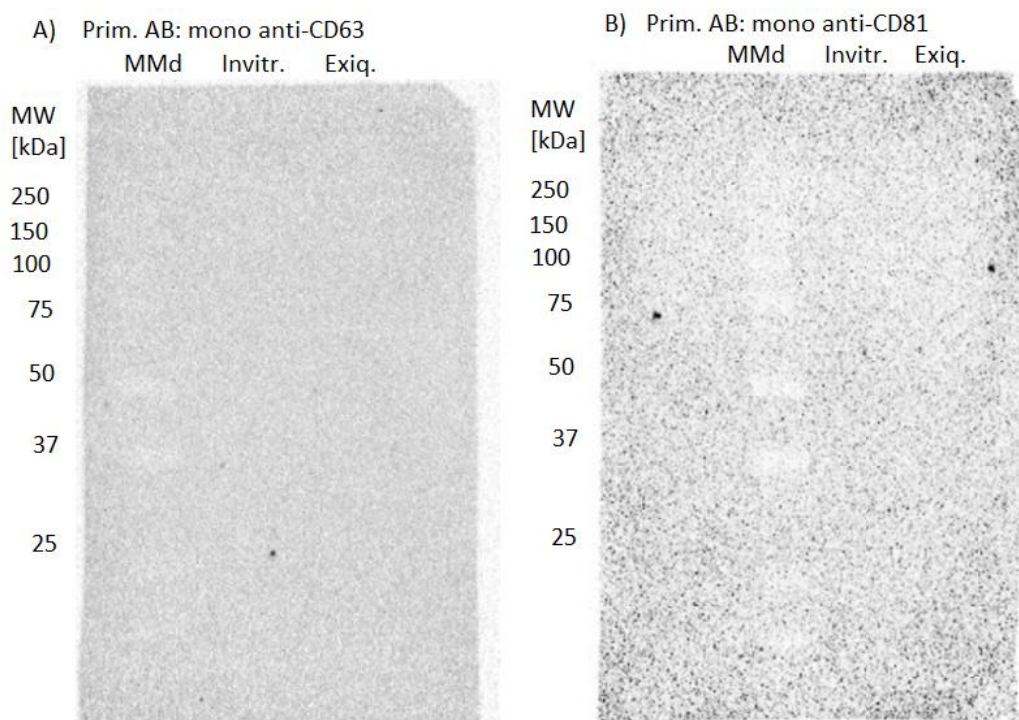
Účinnosť izolácie exozomálnej frakcie z ľudského séra získané komerčnými kitmi od firmy Exiqon a Invitrogen sa porovnala analýzou SDS-PAGE. Vyizolované frakcie sa nadávkovali na 12% polyakrylamidový gél nariadené v pomere $10\text{ }\mu\text{l}$ vzorky k $10\text{ }\mu\text{l}$ vzorkového F s obsahom β -merkaptoethanolu pre rozvoľnenie ľahkých a ťažkých reťazcov IgG. Gél sa po ofarbení koloidným roztokom amoniakálneho striebra vyhodnotil v programe ImageLab. Ako možno vidieť na gély vid' *Obrázok 22* vyizolovaná exozomálna frakcia získaná komerčným kitom od firmy Invitrogen je bohatšia no má vyšší obsah abundantných proteínov, ktoré môžu skresľovať výsledok.



Obrázok 21: Výsledok SDS-PAGE analýzy porovnania dvoch komerčných kitov pre izoláciu exozómov z ľudského séra; 12% polyakrylamidový gél, 5% zaostrovací gél, vzorkový pufer F; farbenie koloidným roztokom amoniakálneho striebra; MM (molekulový marker); Invitr. (vyizolovaná exozomálna frakcia komerčným kitom od firmy Invitrogen); Exiq. (vyizolovaná exozomálna frakcia komerčným kitom od firmy Exiqon)

5.2.2 Overenie účinnosti izolácie exozomálnej frakcie špecifickými protilátkami namierenými proti povrchovým znakom na exozómoch

Na základe predchádzajúcej SDS-PAGE analýzy sme pristúpili k overeniu účinnosti izolácie exozomálnej frakcie z ľudského séra oboma komerčnými testami preblotovaním rozdelených proteínov na nitrocelulózovú membránu vid' metódou Semi-Dry WB, ktorej postup je uvedený v kapitole 4.3. Na gél sa dávkovalo nariadené vzorky izolácie v pomere 5 μ l k 5 μ l vzorkového pufru F. Po blottingu proteínov a blokačnom kroku sa aplikovali na membránu nariadené primárne špecifické myšie monoklonálne anti-ľudské CD63/CD81 IgG (BioLegend) nariadené v pomere 1:1000 blokačného roztoku 5% sušeného mlieka. Po hodinovej inkubácii sa aplikoval konjugát anti-myšie IgG-HRP (Sigma-Aldrich) nariadené 1:10 000 blokačného roztoku 5% sušeného mlieka.



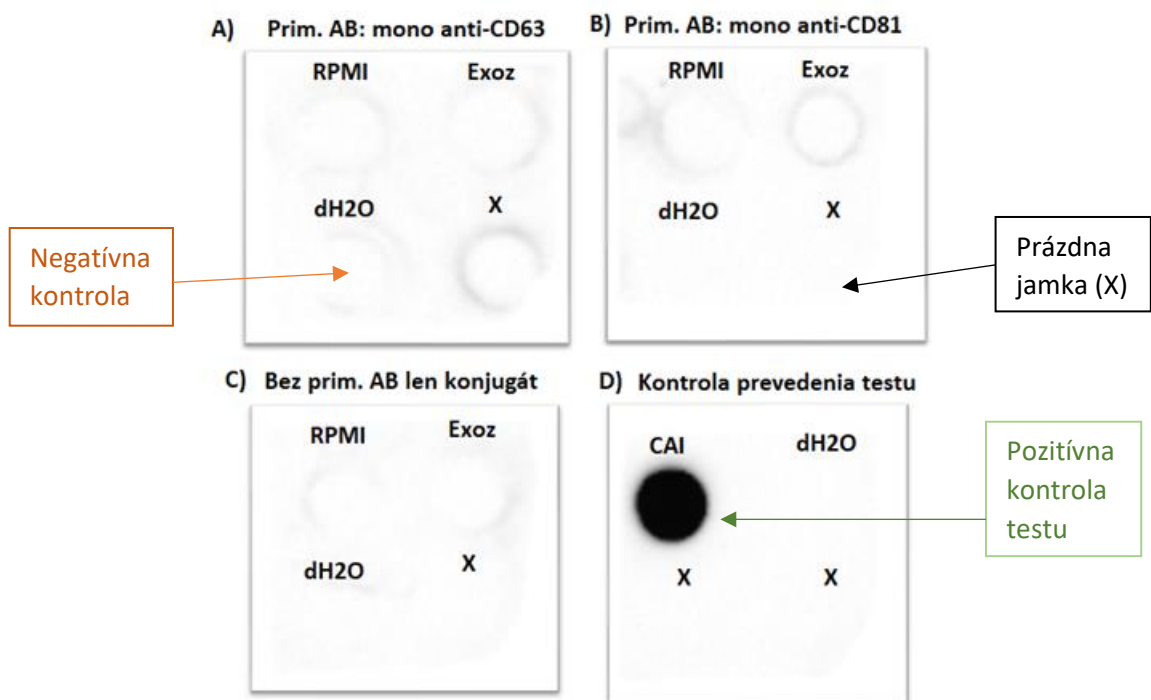
Obrázok 22: Výsledok analýzy WB pre overenie reakcie myších primárnych monoklonálnych anti-ludských CD63 (A) a CD81 (B) s proteínmi CD63 a CD81 po izolácii z ľudského séra. 12% polyakrylamidový gél, 5% zaostrovací gél, vzorkový pufer F; riedenie prim. Ab 1:1000; riedenie konjugátu anti-myšie IgG-HRP 1:10 000; MMd (molekulový marker- dual color); Invitr. (vyizolovaná exozomálna frakcia komerčným kitom od firmy Invitrogen); Exiq. (vyizolovaná exozomálna frakcia komerčným kitom od firmy Exiqon)

Po aplikácii enzymatického substrátu na membránu a vyvolaní v stanici ChemiDoc možno pozorovať, že pravdepodobne nedošlo k špecifickej reakcii primárnych protilátok s enzymatickými povrchovými proteínmi CD63 a CD81, viď Obrázok 23.

5.2.3 Overenie funkčnosti špecifických monoklonálnych protilátok anti-CD63 a anti-81 s CAI ako kontrolou správnosti prevedenia testu

Na základe predchádzajúcej analýzy metódou Semi-Dry WB, pri ktorej sa nepodarilo preukázať reakciu špecifických monoklonálnych anti-CD63 a anti-CD81 protilátok (BioLegend), sa overila funkčnosť týchto protilátok metódou Dot blot na základe postupu uvedenom v kapitole 4.4. Princípom tejto analýzy bolo dokázať, že skúmané protilátky vykazujú afinitu k danému antigénu (Ag), v tomto prípade sa jednalo o exozomálne proteíny CD63 a CD81. Pozitívna reakcia primárnych protilátok a Ag by sa prejavila čiernym spotom po vyvolaní v stanici ChemiDoc. K testu sa použila suspenzia 3 μ l vyizolovanej exozomálnej frakcie nariedené na objem 100 μ l PBS-T pufrom o pH 7,4, ktorá sa dávkovala na PVDF membránu. Izolácia exozómov bola prevedená komerčným kitom od firmy Exiqon z plazmocytného média

RPMI, v ktorom sa predpokladal výskyt exozómov so základnými povrchovými znakmi CD63 a CD81 a ľudského séra. Destilovaná voda slúžila ako negatívna kontrola reakcie špecifických protilátok a CAI ako kontrola správnosti prevedenia testu. Pri CAI sa použili nariedené primárne monoklonálne myšie anti-CAI IgG (ORIGENE) 1:1000 v blokovacom roztoku 5% sušeného mlieka. Ako konjugát sa vo všetkých prípadoch použili anti-myšie IgG-HRP (Sigma-Aldrich) nariedené v pomere 1:10 000 v rovnakom roztoku ako u primárnych protilátok. Pozitívna reakcia primárnych protilátok a Ag by sa prejavila čiernym spotom po vyvolaní v stanici ChemiDoc.



Obrázok 23: Výsledok Dot blot analýzy overenia funkčnosti primárnych myších monoklonálnych anti-ľudských CD63 a CD81 protilátok pri reakcii s proteínmi CD63 a CD81 získaných z plazmocytárneho média RPMI, exozomálnej frakcie zo séra; destilovaná voda (dH₂O) - negatívna kontrola; CAI (karbonická anhydráza I) - pozitívna kontrola prevedenia testu; riedenie prim. Ab 1:1000; riedenie konjugátu anti-myšie IgG-HRP 1:10 000

Výsledok Dot Blot analýzy sa zhoduje s výsledkom Semi-Dry WB analýzou, kde sa taktiež nepreukázala reakcia špecifických monoklonálnych anti-CD63 a CD81 protilátok s exozomálnymi proteínmi získanými ako z RPMI média tak aj z ľudského séra vid' *Obrázok 24 A a B*. Negatívny výsledok u monoklonálnych anti-CD63 a CD81 protilátok mohol byť zapríčinený zlou afinitou týchto protilátok k proteínom CD63 a CD81 alebo ich neprítomnosťou vo vyizolovanej exozomálnej frakcii. Na *Obrázku 24,C*) sa neprejavila nešpecifická reakcia konjugátu s proteínmi séra ani s CD63 a CD81. U reakcie

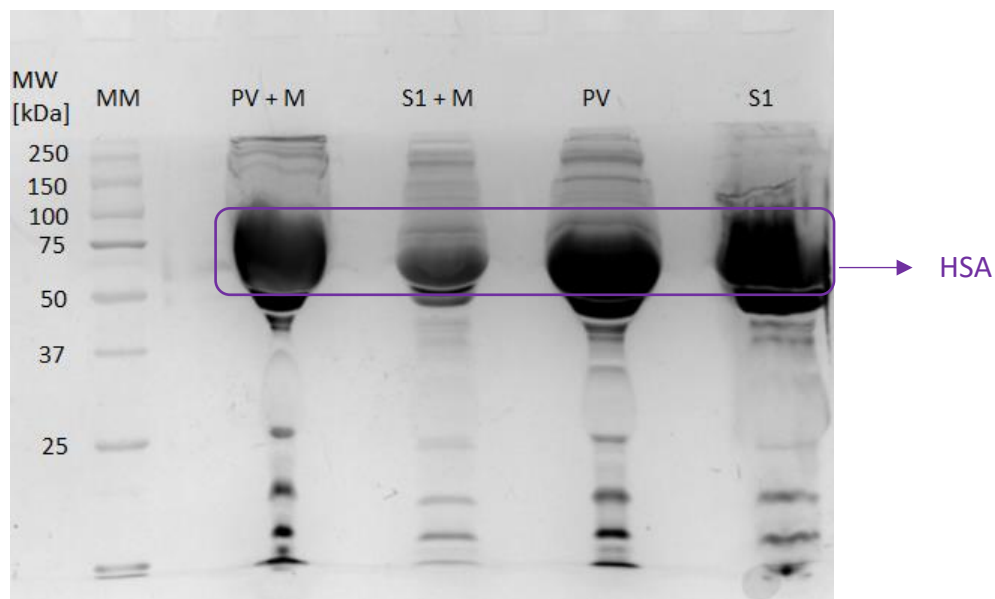
monoklonálnych anti-CAI IgG s CAI sa dokázala afinita týchto protilátok čiernym spotom a tým sa potvrdila správnosť prevedenia testu, vid' *Obrázok 24, D*).

5.3 Optimalizácia izolácie exozomálnej frakcie komerčným testom

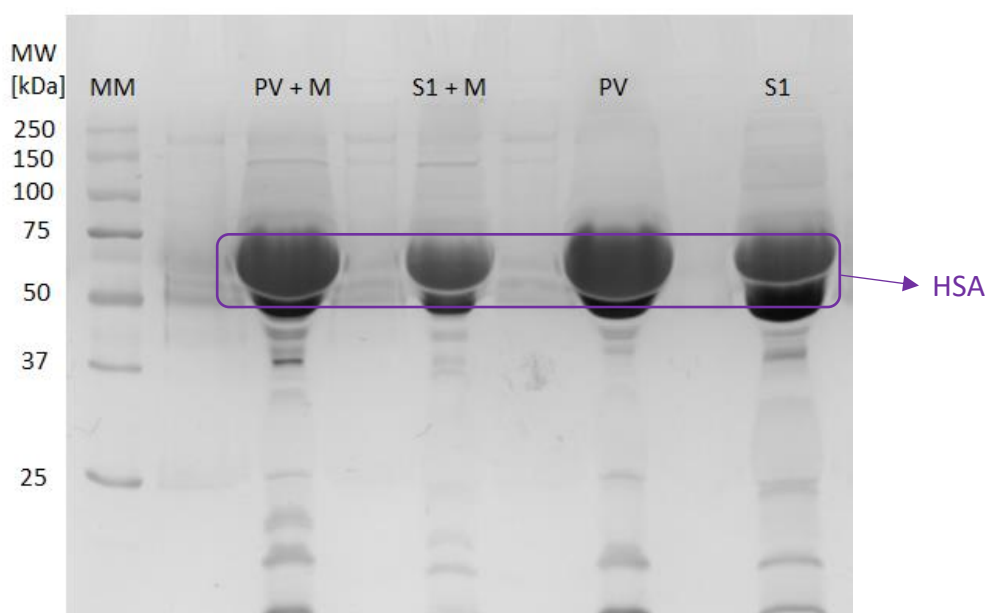
Po neúspešnom preukázaní afinitnej reakcie špecifických monoklonálnych myších anti-CD63 a CD81 IgG sa prišlo k použitiu polyklonálnych králičích anti-CD63 IgG (Invitrogen) pre reakciu s exozomálnymi proteínmi. Izolácia exozómov zo séra bola prevedená komerčným kitom od firmy Invitrogen na základe postupu vid' kapitola 4.5. Vzhľadom k tomu, že pri použití tohto komerčného kitu vyizolovaná frakcia obsahovala už v predchádzajúcej analýze zvýšený obsah abundantných proteínov najmä ľudského sérového albumínu (HSA) bolo potrebné optimalizovať podmienky izolácie. V tejto analýze sa použili dva typy vzorky séra čerstvé a zmrazené. Pri čerstvom sére sa rovno po odobratí rozdelilo na 2 aliquoty o objemu 1 ml. Prvý obsahoval prídavok 2 M močoviny a druhý bol bez prídavku. Následné prebehla izolácia exozómov zo 100 μ l séra oboch typov. U zmrazeného séra uschovaného dva dni po odbere pri teplote $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bol postup rovnaký.

5.3.1 Overenie optimalizácie izolácie exozómov s prídavkom 2 M močoviny z čerstvého a mrazeného séra metódou SDS-PAGE a Western blot

Pre overenie optimalizácie izolácie s prídavkom 2 M močoviny uskutočnila SDS-PAGE analýza v 12% polyakrylamidovom gély. Na gél sa dávkovali pôvodné vzorky čerstvého (mrazeného) séra s/bez prídavku močoviny a vyizolované frakcie s/bez obsahu močoviny nariadené v pomere 10 μ l vzorky ku 10 μ l vzorkového pufru F. Po separácii proteínov sa gél ofarbil koloidným roztokom amoniakálneho striebra vid' *Obrázok 25 – 26*.



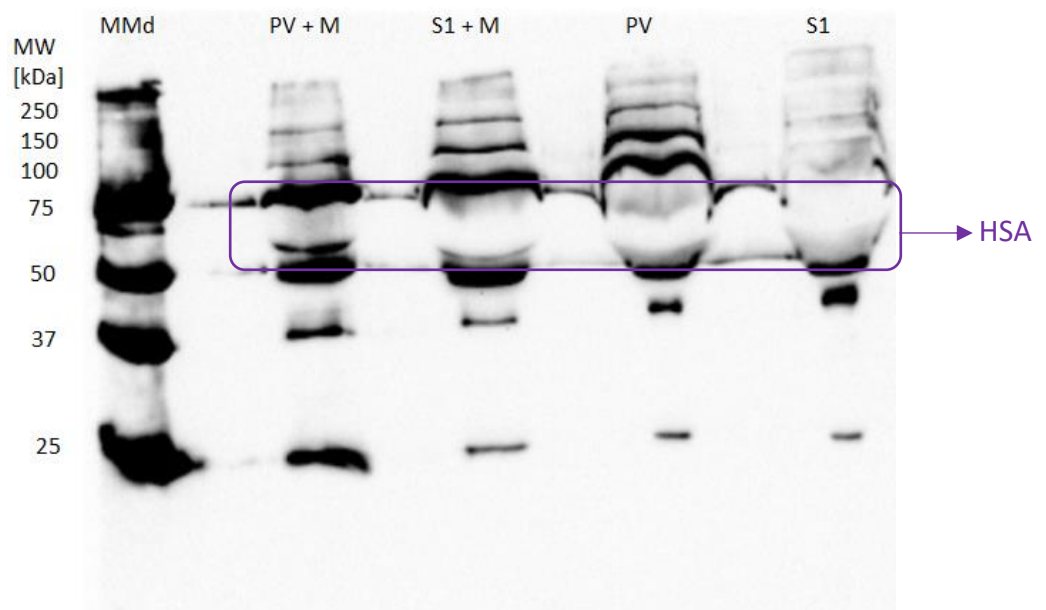
Obrázok 24: Výsledok SDS-PAGE analýzy vplyvu prídavku močoviny (*M*) k vzorke čerstvého séra pred izoláciou exozomálnej frakcie komerčným kitom od firmy Invitrogen; 12% polyakrylamidový gél, 5% zaostrovací gél, vzorkový pufer *F*; farbenie koloidným roztokom amoniakálneho striebra; *MM* (molekulový marker); *PV + M* (pôvodná vzorka séra s prídavkom močoviny); *S1 + M* (vyizolovaná exozomálna frakcia s prídavkom močoviny); *PV* (pôvodná vzorka séra bez prídavku močoviny); *S1* (vyizolovaná exozomálna frakcia bez prídavku močoviny)



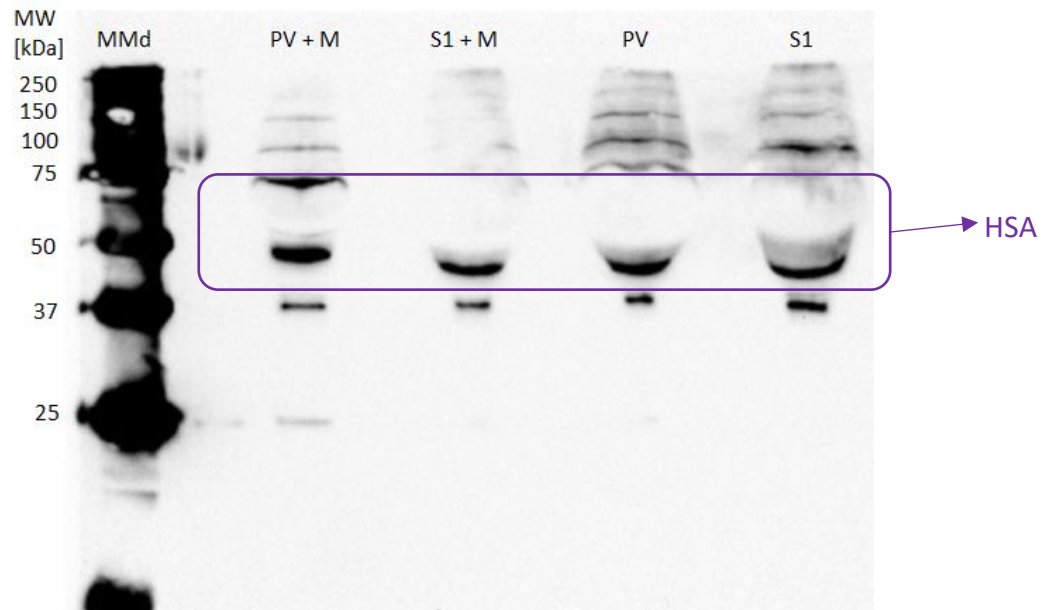
Obrázok 25: Výsledok SDS-PAGE analýzy vplyvu prídavku močoviny (*M*) k vzorke mrazeného séra pred izoláciou exozomálnej frakcie komerčným kitom od firmy Invitrogen; 12% polyakrylamidový gél, 5% zaostrovací gél, vzorkový pufer *F*; farbenie koloidným roztokom amoniakálneho striebra; *MM* (molekulový marker); *PV + M* (pôvodná vzorka séra s prídavkom močoviny); *S1 + M* (vyizolovaná exozomálna frakcia s prídavkom močoviny); *PV* (pôvodná vzorka séra bez prídavku močoviny); *S1* (vyizolovaná exozomálna frakcia bez prídavku močoviny)

Výsledky SDS-PAGE analýzy potvrdili, že do istej miery má prídavok 2 M močoviny pred izoláciou vplyv na odstránenie abundantných proteínov ako HSA z čerstvého (mrazeného) séra. Vyizolovaná exozomálna frakcia s prídavkom močoviny (S1 + M) obsahovala oproti frakcii bez močoviny vizuálne menej abundantných proteínov séra. Čo sa týka použitia čerstvého alebo mrazeného séra pre izoláciu nebol zistený markantný rozdiel. Z tohto dôvodu sa ďalej používalo pre izoláciu už len mrazené ľudské sérum.

Vplyv prídavku 2 M močoviny sa overil aj „blottingom“ separovaných proteínov na nitrocelulózovú membránu metódou Semi-Dry WB zariadením Trans-Blot SD (Bio-Rad) vid' *Obrázok 27 – 28*. Ako primárne protilátky sa použili polyklonálne králičie anti-CD63 IgG (Invitrogen) nariadené v pomere 1:1000 blokovacieho roztoku 5% sušeného mlieka. Na membránu sa aplikoval 1,5 ml tejto suspenzie protilátok. Po hodinovej inkubácii sa aplikoval na membránu 1,5 ml suspenzie konjugátu anti-králičie IgG-HRP nariadené 1:10 000 (Sigma-Aldrich) v rovnakom roztoku ako u primárnych protilátok.



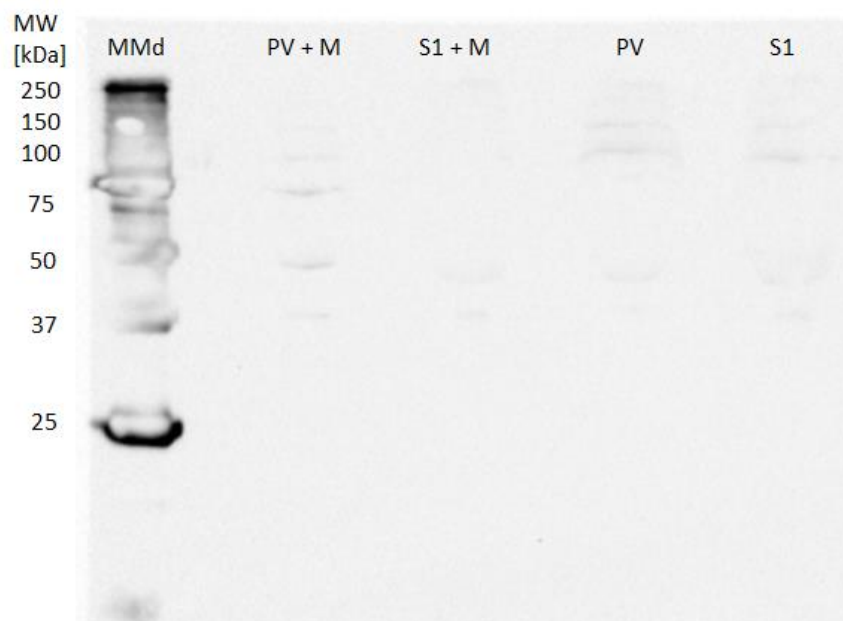
Obrázok 26: Výsledok WB analýzy vplyvu prídavku močoviny (M) k vzorke čerstvého séra pred izoláciou exozomálnej frakcie komerčným kitom od firmy Invitrogen; 12% polyakrylamidový gél, 5% zaostrovaný gél, vzorkový pufer F; riedenie prim. králičej polyklonálnych anti-ľudských CD63 protilátok 1:1000; riedenie konjugátu anti-králičích IgG-HRP 1:10 000; MMd (molekulový marker dual color); PV + M (pôvodná vzorka séra s prídavkom močoviny); S1 + M (vyizolovaná exozomálna frakcia s prídavkom močoviny); PV (pôvodná vzorka séra bez prídavku močoviny); S1 (vyizolovaná exozomálna frakcia bez prídavku močoviny)



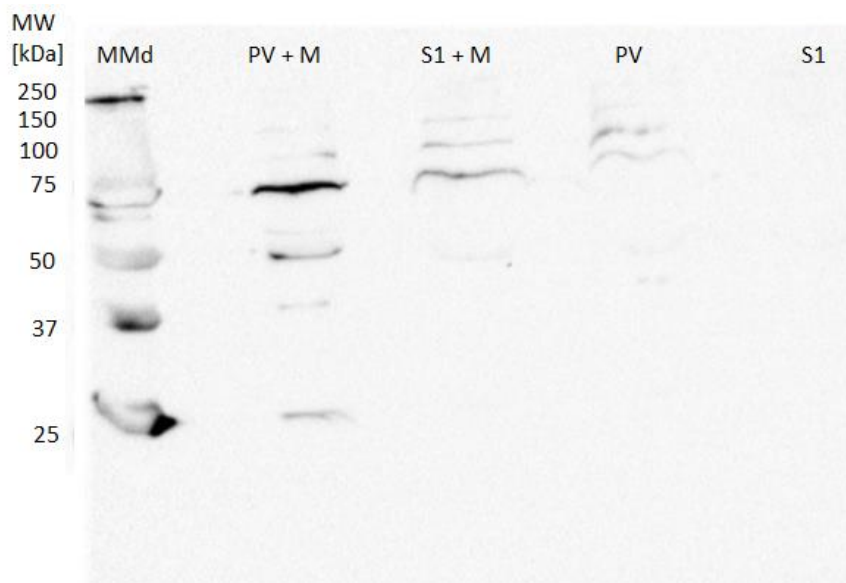
Obrázok 27: Výsledok WB analýzy vplyvu prídavku močoviny (M) k vzorke zmrazeného séra pred izoláciou exozomálnej frakcie komerčným kitom od firmy Invitrogen; 12% polyakrylamidový gél, 5% zaostrovací gél, vzorkový pufer F; riedenie prim. králičej polyklonálnych anti-ludských CD63 protilátok 1:1000; riedenie konjugátu anti-králičích IgG-HRP 1:10 000; MMd (molekulový marker dual color); PV + M (pôvodná vzorka séra s prídavkom močoviny); S1 + M (vyizolovaná exozomálna frakcia s prídavkom močoviny); PV (pôvodná vzorka séra bez prídavku močoviny); S1 (vyizolovaná exozomálna frakcia bez prídavku močoviny)

Ako možno vidieť na Obrázku 25 – 26 výsledok Semi-Dry WB analýzy poukázal na nešpecifickú reakciu konjugátu s proteínmi obsiahnutými v molekulovom markery. Z analýzy nebolo možné určiť či sa jednalo o afinitnú reakciu primárnych polyklonálnych anti-CD63 IgG (Invitrogen) s exozomálnym proteínom CD63, čím by sa potvrdila prítomnosť exozómov v čerstvom (mrazenom) sére.

Kvôli podozreniu na nešpecifickú skríženú reakciu konjugátu z predchádzajúceho výsledku sa urobil „rebinding“ protilátok, postup vid' kapitola 4.3.1 ktorý pozostával z uvoľnenia väzby ako primárnych tak aj sekundárnych protilátok z membrány pomocou 100 mM glycín – HCl puferu o pH 2,6 a premytí s PBS-T o pH 7,4. Následne sa na membránu opäť aplikoval konjugát anti-králičie IgG-HRP (Sigma-Aldrich) tentokrát bez použitia primárnych polyklonálnych anti-CD63 IgG. Ako možno vidieť na Obrázku 29 – 30 opätovne došlo k vizualizácii molekulového markeru čím sa potvrdila nešpecifická reakcia konjugátu s proteínmi markeru.



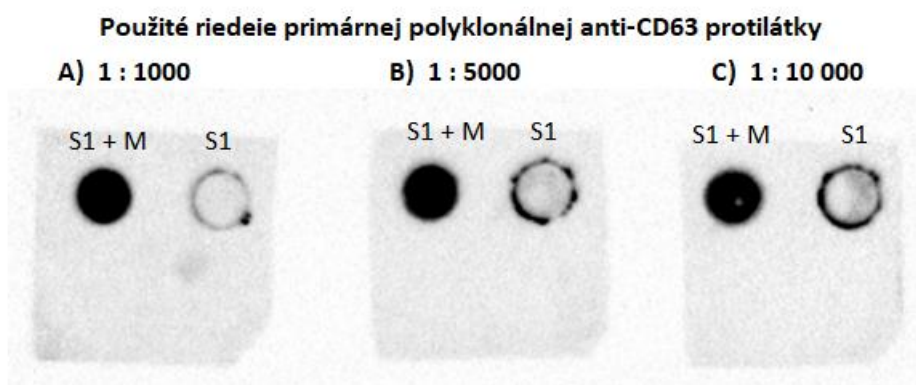
Obrázok 28: Výsledok WB analýzy pre „rebinding“ Ab na overenie nešpecifickej reakcie konjugátu s molekulovým markerom bez prídavku primárnej polyklonálnej anti-CD63 protilátky; 12% polyakrylamidový gél, 5% zaostrovací gél, vzorkový pufer F; riedenie konjugátu anti-králičích IgG-HRP 1:10 000; MMd (molekulový marker dual color); PV + M (pôvodná vzorka séra s prídavkom močoviny); S1 + M (vyizolovaná exozomálna frakcia s prídavkom močoviny); PV (pôvodná vzorka séra bez prídavku močoviny); S1 (vyizolovaná exozomálna frakcia bez prídavku močoviny)



Obrázok 29: Výsledok WB analýzy pre „rebinding“ Ab na overenie nešpecifickej reakcie konjugátu s molekulovým markerom bez prídavku primárnej polyklonálnej anti-CD63 protilátky; 12% polyakrylamidový gél, 5% zaostrovací gél, vzorkový pufer F; riedenie konjugátu anti-králičích IgG-HRP 1:10 000; MMd (molekulový marker dual color); PV + M (pôvodná vzorka séra s prídavkom močoviny); S1 + M (vyizolovaná exozomálna frakcia s prídavkom močoviny); PV (pôvodná vzorka séra bez prídavku močoviny); S1 (vyizolovaná exozomálna frakcia bez prídavku močoviny)

5.3.2 Overenie funkčnosti špecifických polyklonálnych anti-CD63 protilátok s následnou optimalizáciou použitého riedenia

Pre overenie funkčnosti špecifických polyklonálnych králičích anti-CD63 IgG (Invitrogen) sa opäť použila metóda Dot blot na základe postupu uvedenom v kapitole 4.4. Princípom tejto analýzy je dokázanie, že skúmané protilátky vykazujú afinitu k danému antigénu (Ag), v tomto prípade sa jedná o diagnostický exozomálny proteín CD63. Pozitívna reakcia primárnych protilátok a Ag sa prejaví čiernym spotom po vyvolaní v stanici ChemiDoc. K testu sa použila suspenzia 3 μ l vyizolovanej exozomálnej frakcie nariadenej na objem 100 μ l PBS-T pufrom o pH 7,4, ktorá sa dávkovala na PVDF membránu. Použili sa tri druhy riedenia pre primárnu protilátku vid' *Obrázok 31*. Riedenie konjugátu anti-králičie IgG-HRP bolo 1:10 000 (Sigma-Aldrich) blokovacieho roztoku. Na izoláciu exozómov zo zmrazeného ľudského séra bol použitý komerčný kit od firmy Invitrogen. K 150 μ l jedného aliquotu ľudského séra sa opäť pridala 2 M močovina zatiaľ čo k druhému nie. Močovina sa opäť pridávala k séru pre overenie vplyvu čistejšiu izoláciu s nižším obsahom abundantných proteínov séra.



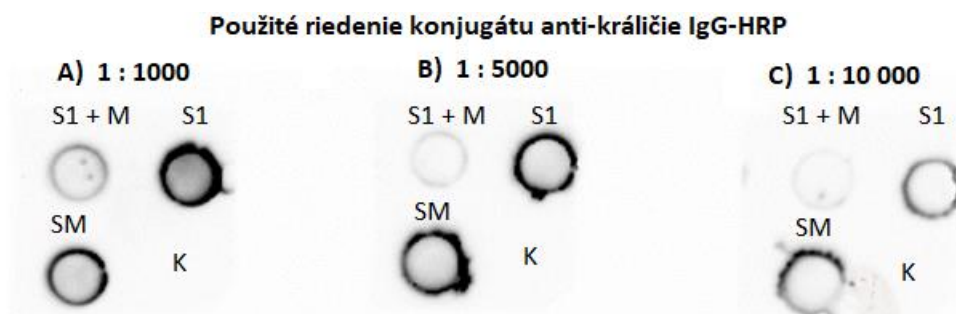
Obrázok 30: Výsledok Dot blot analýzy overenia funkčnosti králičích polyklonálnych anti-ľudských CD63 IgG pri rôznom riedení v reakcii s proteínmi CD63 izolovanými z ľudského séra. Riedenie konjugátu anti-králičie IgG-HRP – 1:10 000; S1 + M (vyizolovaná exozomálna frakcia s prídavkom močoviny); S1 (vyizolovaná exozomálna frakcia bez prídavku močoviny)

Ako možno vidieť z výsledku Dot blot analýzy predpokladá sa, že došlo k reakcii primárnych polyklonálnych králičích anti-CD63 IgG vo všetkých použitých riedeniach s proteínmi CD63 čím sa preukázala aj ich funkčnosť. Ďalej sa opäť prejavil vplyv prídavku 2 M močoviny k séru pred izoláciou. U sér bez prídavku močoviny bol síce vidieť náznak reakcie protilátok ale akoby dochádzalo k ich vymývaniu.

5.3.3 Overenie nešpecifickej reakcie konjugátu o rôznom stupni riedenia

Rovnako ako v predchádzajúcej kapitole 5.3.2 sa použila metóda Dot blot s rovnakým princípom a postupom prevedenia až na výnimku že na PVDF membránu neaplikovali

primárne polyklonálne králičie anti-CD63 IgG (Invitrogen) len konjugát anti-králičie IgG-HRP (Sigma-Aldrich) pre overenie nešpecifickej reakcie konjugátu o rôznom riedení (viď *Obrázok 32*), ktorý sa riedil v pomere k blokovaciemu roztoku 5% sušeného mlieka. Exozomálna frakcia sa opäť izolovala z ľudského mrazeného séra komerčným kitom od firmy Invitrogen. Použili sa tri druhy aliquotov séra, kde k prvému sa pridala 2 M močovina ešte pred izoláciou, u druhého sa nepridala vôbec a k tretiemu sa pridala až po izolácii k výslednej vyzolovanej frakcii exozómov. Ako kontrola u tohto testu slúžilo 1% BSA.



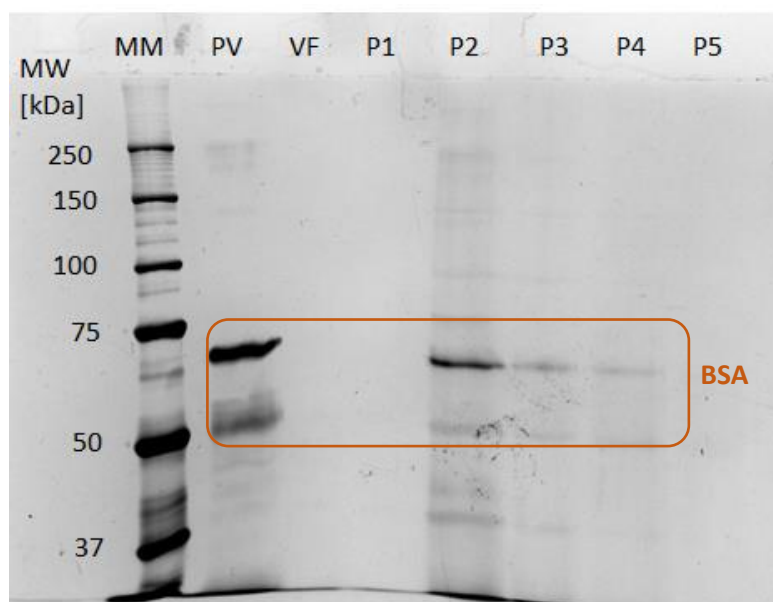
Obrázok 31: Výsledok Dot blot analýzy overenia nešpecifickej skríženej reakcie konjugátu anti-králičích IgG-HRP pri rôznom riedení s proteínmi CD63 izolovaných z ľudského séra bez prídavku primárnej králičej polyklonálnej anti-CD63 protilátky. S1 + M (vyizolovaná exozomálna frakcia s prídavkom močoviny pred izoláciou); S1 (vyizolovaná exozomálna frakcia bez prídavku močoviny); SM (vyizolovaná exozomálna frakcia s prídavkom močoviny po izolácii); K (kontrola, 1% BSA)

Z výsledku Dot blot analýzy možno usudzovať že sa opäť overila skrížená nešpecifická reakcia konjugátu s proteínmi ľudského séra. Tak isto vidieť, že opäť prídavok močoviny má tento výsledok vplyv pretože najslabšia reakcia je v jamkách s prídavkom močoviny ešte pred izoláciou. Najsilnejšia reakcia konjugátu je v jamkách bez prídavku močoviny. Značný vplyv na tento výsledok malo aj použité riedenie, kde pri najväčšom riedení 1:10 000 je slabšia reakcia oproti nižším riedeniam.

5.4 Príprava imunosorbentu s následnou izoláciou exozómov na základe ich povrchových znakov a overenie jeho funkčnosti metódami SDS-PAGE a Semi-dry Western blot

Obdobne ako v prípade modelového systému pre prípravu imunosorbentu postupom zosieťovania s DMP, kde sa na magnetické častice BcMag Proteín G (Bioclone) imobilizovali monoklonálne anti-CAI IgG (ORIGENE), viď kapitola 5.1.1 je postup rovnaký ale s tým rozdielom, že teraz sa imobilizovali polyklonálne králičie anti-CD63 IgG

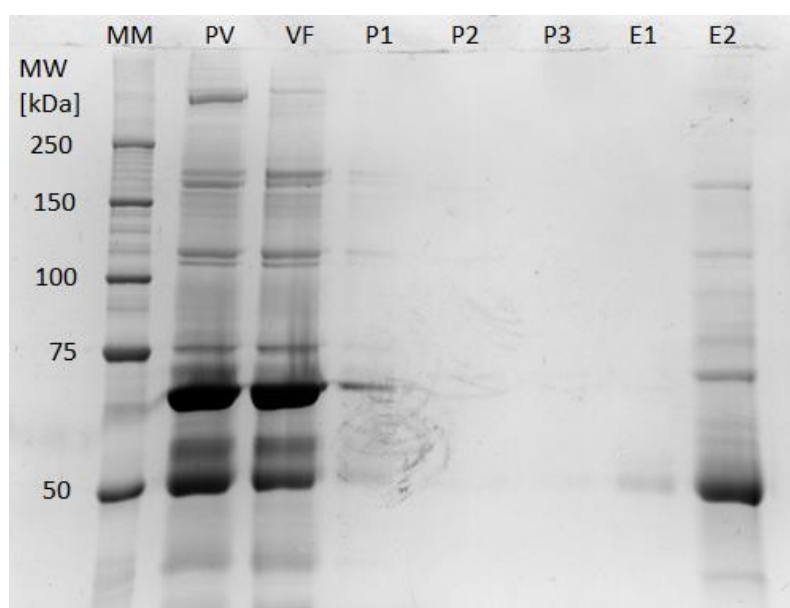
(Invitrogen). Pre overenie imobilizácie protilátok sa použila metóda SDS-PAGE, kde sa na 10% polyakrylamidový gél nadávkovali jednotlivé frakcie nariadené 10 μ l vzorky k 10 μ l vzorkového pufru F. Gél sa po rozdelení proteínov ofarbil koloidným amoniakálnym roztokom striebra vid' *Obrázok 33*. Na základe výsledku SDS-PAGE analýzy sa ukázalo, že došlo k naviazaniu polyklonálnych králičích anti-CD63 IgG na magnetický nosič. Vo frakciách, kde dochádzalo k zosieťovaniu (P2 – P4) v prostredí DMP, sa časť protilátok uvoľnila v dôsledku prechodu z pH 5,0, v ktorom prebiehala väzba (VF) do pH 8,0. Ďalej možno pozorovať uvoľnenie BSA, ktorý je obsiahnutý magnetickom nosiči no na základe optimalizácie prípravy imunosorbentu premytím magnetických častíc dvakrát v 50 μ l 0,05% TFA ešte pred väzbou protilátok sa neuvoľnilo až také množstvo BSA.



Obrázok 32: Výsledok SDS-PAGE analýza imobilizácie polyklonálnych králičích anti-ľudských CD63 IgG na nosič BcMag Proteín G. 10% polyakrylamidový gél, 5% zaostrovací gél, vzorkový pufer F; farbenie koloidným roztokom amoniakálneho striebra; MM (molekulový marker); PV (králičie anti-ľudské CD63 IgG); VF (väzbová frakcia v MES pufru); P1 (premytie v PBS-T o pH 7,4); P2 (zosieťovanie s ethanolamínom o pH 8,0); P3 (inkubácia v ethanolamíne s DMP); P4 (inkubácia v triethanolamíne); P5 (premytie v PBS-T o pH 7,4)

Po úspešnom naviazaní polyklonálnych králičích anti-CD63 IgG na magnetický nosič BcMag Proteín G sa prišlo k overeniu jeho funkčnosti izoláciou exozómov na základe väzby imunosorbentu s exozomálnymi proteínmi CD63. K vopred pripravenému imunosorbentu sa pridalo 200 μ l suspenzie Ag (25 μ l vyizolovanej frakcie exozómov / ml PBS-T o pH 7,4), získaného izoláciou exozómov z ľudského séra komerčným kitom od firmy Invitrogen. Po väzbe Ag v prostredí PBS-T o pH 7,4 a následnom premytí nosiča pre odstránenie

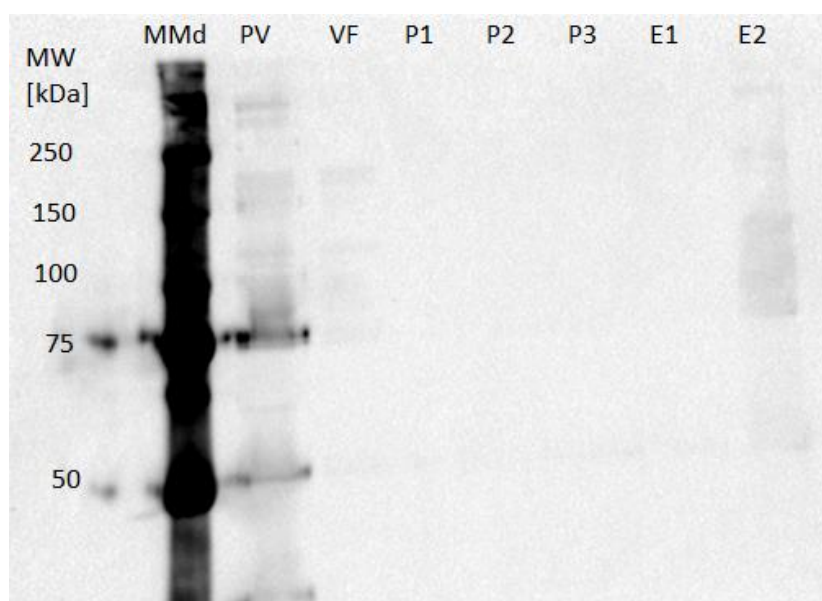
nenaviazaných zbytkov Ag sa prišlo k elúcii Ag z imunosorbentu 50 μ l 0,05% TFA o pH 2 – 3. Všetky frakcie vrátane pôvodnej vzorky vyizolovanej frakcie exozómov sa nadávkovali na 10% polyakrylamidový gél nariadené v pomere 10 μ l vzorky ku 10 μ l vzorkového pufru F. Po rozdelení proteínov metódou SDS-PAGE sa gél ofarbil koloidným roztokom amoniakálneho striebra vid' *Obrázok 34*. Z výsledku SDS-PAGE analýzy možno pozorovať, že nedošlo takmer k žiadnej väzbe Ag na imunosorbent, keďže väzbová frakcia vyzerá takmer identicky ako pôvodná vzorka obsahujúca vyizolovanú exozomálnu frakciu a zvyšok sa uvoľnil pri elúcii v 0,05% TFA.



Obrázok 33: Výsledok SDS-PAGE účinnosti imunosorbentu BcMag-Proteín G s imobilizovanými polyklonálnymi králičími anti-ľudskými CD63 IgG pri väzbe exozomálnych proteínov CD63 s následnou elúciou; 10% polyakrylamidový gél, 5% zaostrovací gél, vzorkový pufer F; farbenie koloidným roztokom amoniakálneho striebra; MM (molekulový marker); PV (pôvodná vzorka, vyizolovaná exozomálna frakcia); VF (väzba Ag v MES pufrí o pH 7,4); P1 a P3 (premyvávanie v PBS-T o pH 7,4); P2 (premyvávanie v PBS-T o pH 7,4 s 1M NaCl); E1-E2 (elúcia v 0,05% TFA)

Pre overenie účinnosti imunosorbentu a zároveň prítomnosti exozomálneho proteínu vo vyizolovanej frakcii z ľudského séra sa použila metóda Semi-dry WB. Postup tejto metódy bol stále rovnaký ako v predchádzajúcich kapitolách. Na 10 % polyakrylamidový gél sa nadávkovali jednotlivé frakcie ako u gélu vid' *Obrázok 34* nariadené v pomere 5 μ l vzorky ku 5 μ l vzorkového pufru F. Po rozdelení proteínov nasledoval blotting na nitrocelulóзовú membránu. Ako primárna protilátka sa použili polyklonálne králičie anti-CD63 IgG (Invitrogen) riedené 1:1000 blokovačieho roztoku 5% sušeného mlieka. Konjugát anti-králičie

IgG-HRP (Sigma-Aldrich) sa riedil v pomere 1:10 000 rovnakého roztoku ako u primárnych protilátok. Po aplikácii enzymatického substrátu sa membrána nechala vyvolať v prístroji ChemiDoc (viď *Obrázok 35*). Z výsledku analýzy metódou Semi-Dry WB vidieť, že sa nepodarilo preukázať prítomnosť exozomálneho proteínu v elučných frakciách (E1-E2) a ani v pôvodnej vzorke (PV) vyizolovanej exozomálnej frakcie z ľudského séra. Ďalej možno opäť pozorovať nešpecifickú reakciu konjugátu s proteínmi ľudského séra, ktorá sa prejavila vizualizáciou molekulového markeru.



Obrázok 34: Výsledok WB analýzy účinnosti imunosorbentu BcMag-Proteín G s imobilizovanými polyklonálnymi králičími anti-ľudskými CD63 IgG pri väzbe exozomálnych proteínov CD63 s následnou elúciou; 10% polyakrylamidový gél, 5% zaostrovací gél, vzorkový pufer F; riedenie primárnych polyklonálnych anti-CD63 IgG 1:1000; riedenie konjugátu anti-králičích IgG-HRP 1:10 000; MM (molekulový marker); PV (pôvodná vzorka, vyizolovaná exozomálna frakcia); VF (väzba v MES pufrí o pH 7,4); P1 a P3 (premyvávanie v PBS-T o pH 7,4); P2 (premyvávanie v PBS-T o pH 7,4 s 1M NaCl); E1-E2 (elúcia v 0,05% TFA)

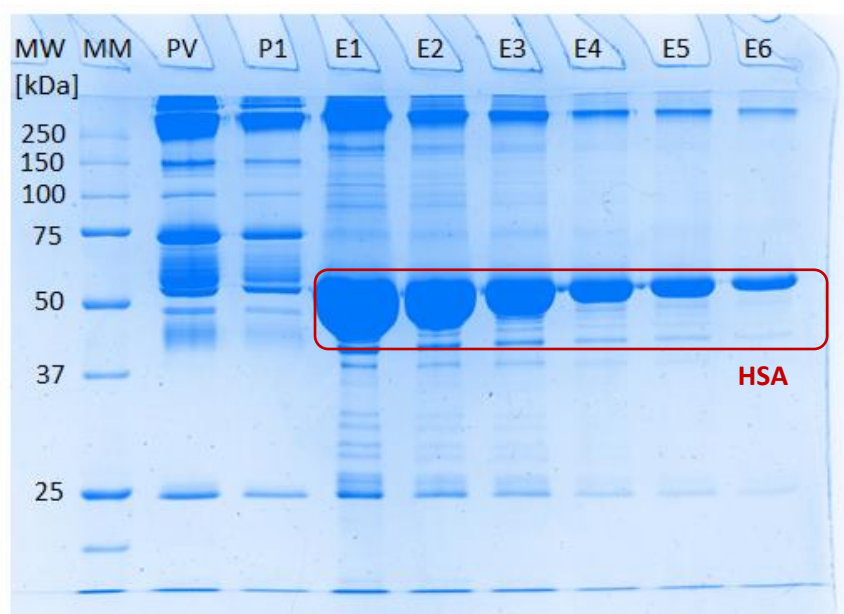
5.5 Odstránenie abundantných proteínov zo séra pre optimalizáciu izolácie exozómov komerčným testom

Keďže pri izolácii exozomálnej frakcie z ľudského séra komerčným testom od firmy Invitrogen vždy ostane určité množstvo abundantných proteínov prednostne HSA, ktoré môžu brániť kvalitnej izolácii bolo nutné HSA zo séra odstrániť. Na depléciu HSA z ľudského séra sa použil komerčný imunoprecipitačný kit PureProteome™ Albumin Magnetic Beads od firmy Merck.

Princípom testu bolo vychytanie HSA na magnetický nosič s imobilizovanými špecifickými IgG namierenými proti ľudskému HSA.

5.5.1 Overenie deplécie HSA zo séra elúciou z komerčného magnetického nosiča metódou SDS-PAGE

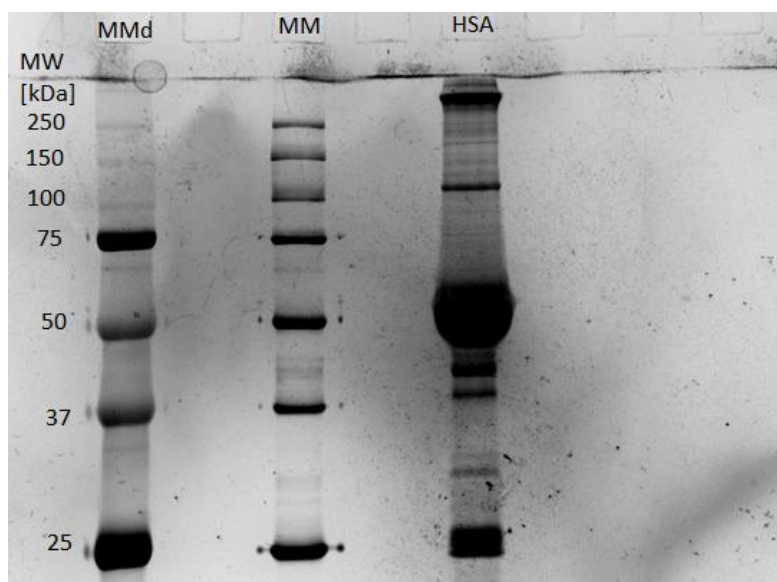
Na základe postupu uvedenom v kapitole 4.8 sa zo séra pomocou komerčného testu depletovalo HSA, ktoré by mohlo brániť izolácii exozómov. Po vyviazaní HSA zo 100 μ l séra, ktoré bolo nariadené na objem 400 μ l PBS pufrom sa magnetický nosič sa premýval v 3 ml roztoku PBS o pH 7,4. Po premytí nosiča sa aplikovalo šesťkrát 500 μ l elučného glycín-HCl pufru o pH 2,0. Overenie účinnosti deplécie HSA sa preverilo metódou SDS-PAGE, kde sa na 12% polyakrylamidový gél nadávkovali jednotlivé frakcie (viď *Obrázok 36*) v pomere 10 μ l vzorky k 10 μ l vzorkového pufru G. Po rozdelení proteínov sa gél ofarbil komerčným farbivom Commasie brilliant blue postupom uvedeným v kapitole 4.2.2. Z výsledku SDS-PAGE analýzy možno vidieť, že sérum bolo zbavené väčšiny HSA vid' frakcia vzorky séra po deplécii (PV), čo sa prejavilo aj na elučných frakciách E1 až E6.



Obrázok 35: Výsledok SDS-PAGE analýzy deplécie HSA zo séra komerčným kitom od firmy Merck s následnou elúciou; 12% polyakrylamidový gél, 5% zaostrovací gél, vzorkový pufer G; farbenie Commasie brilliant blue; MM (molekulový marker); PV (pôvodná vzorka, sérum zbavené HSA); P1 (premyvacia rakcia v PBS o pH 7,4); E1-E6 (elučné frakcie HSA v Glycín-HCl pufré o pH 7,2)

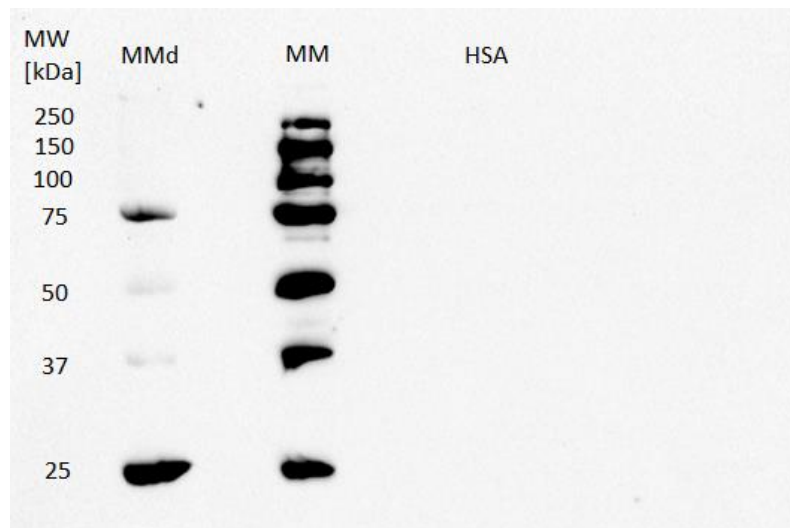
5.5.2 Overenie nešpecifickej reakcie konjugátu s molekulovými markermi a HSA získaným depléciou zo séra metódami SDS-PAGE a Semi-dry Western blot

Vzhľadom k tomu, že už niekoľkokrát sa dokázala nešpecifická reakcia konjugátu anti-králičie IgG-HRP (Sigma-Aldrich) s proteínmi molekulového markeru dual color používaným u metóde Western blot vyskúšali sme aj reakciu s proteínmi klasického markeru používaného pri SDS-PAGE analýze. Zároveň sme overovali nešpecifickú skríženú reakciu konjugátu s HSA vyizolovaným z ľudského séra komerčným testom od firmy Merck vid' predchádzajúca kapitola. Na 10% polyakrylamidový gél sa v oboch prípadoch analýz metódami SDS-PAGE aj Semi-Dry WB dávkoval 3 μ l molekulových markerov a nariedenú vzorku HSA v pomere 5 μ l k 5 μ l vzorkového pufru G. Pri SDS-PAGE sa gél ofarbil koloidným roztokom amoniakálneho striebra vid' *Obrázok 37*.



Obrázok 36: Výsledok SDS-PAGE analýzy pre overenie deplecie HSA zo séra komerčným kitom od firmy Merck; 12% polyakrylamidový gél, 5% zaostrovač gél, vzorkový pufer G; farbenie koloidným roztokom amoniakálneho striebra; MMd (molekulový marker dual color); MM (molekulový marker); HSA frakcia (ľudský sérový albumín depletovaný zo séra)

Pri predchádzajúcej SDS-PAGE analýze rozdelenia proteínov nasledoval blotting na nitrocelulózovú membránu. Ako primárna protilátka sa použili polyklonálne anti-králičie IgG (Invitrogen) nariedené 1:1000 blokovacieho roztoku 5% sušeného mlieka. Konjugát bol riedený v pomere 1:10 000 rovnakého roztoku ako u primárnej protilátky vid' *Obrázok 38*. Po aplikácii enzymatického substrátu sa membrána vyvolala v prístroji ChemiDoc.

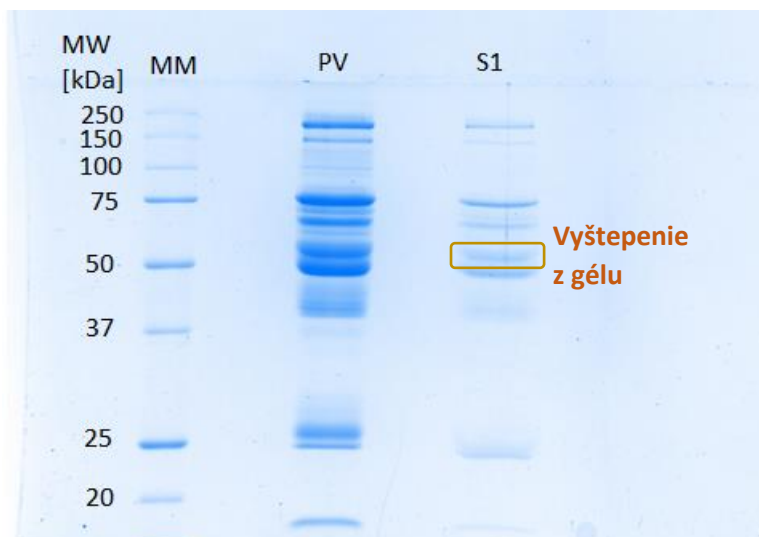


Obrázok 37: Výsledok WB analýzy overenia nešpecifickej skríženej reakcie konjugátu s molekulovými markermi. 12% polyakrylamidový gél, 5% zaostrovací gél, vzorkový pufer G; riedenie konjugátu anti-králičích IgG-HRP 1:10 000; MMd (molekulový marker dual color); MM (molekulový marker); HSA frakcia (ľudský sérový albumín depletovaný zo séra)

Z výsledku Semi-Dry WB analýzy sa dokázala opätovne nešpecifická reakcia konjugátu s proteínmi molekulových markerov. U klasického markeru používaného pri SDS-PAGE analýze dokonca bola reakcia silnejšia ako u dual color. Čo sa týka HSA nebola preukázaná nešpecifická reakcia s konjugátom.

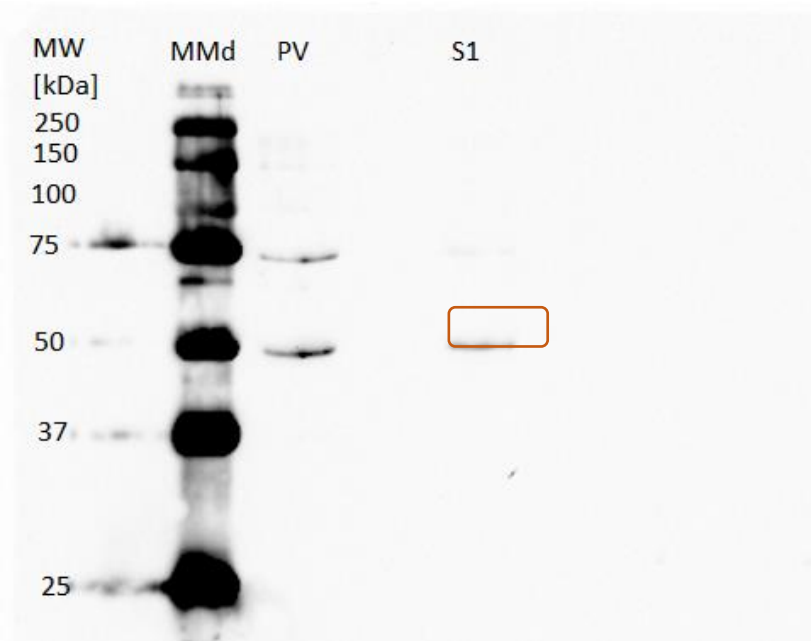
5.5.3 Izolácia exozomálnej frakcie komerčným testom z ľudského séra zbaveného abundantných proteínov

U predchádzajúcich izoláciách exozómov komerčným testom od firmy Invitrogen mohli abundanté proteíny ako HSA brániť účinnosti izolácie. Z tohto dôvodu sme pomocou komerčného imunoprecipitačného testu na báze magnetického nosiča s imobilizovanými protilátkami namierenými proti HSA depletovali z veľkej väčšiny tento proteín zo séra vid' kapitola 5.5.1. Následne sme z takéhoto séra zbaveného albumínu izolovali exozómy. Postup izolácie bol rovnaký ako v predchádzajúcich prípadoch až na to že pôvodná vzorka séra bola zbavená väčšiny HSA. Vzorky sa dávkovali na 12% polyakrylamidový gél v pomere 10 μ l k 10 μ l vzorkového pufru F. Po rozdelení proteínov sa gél ofarbil komerčným farbivom Commasie brilliant blue vid' Obrázok 39.



Obrázok 38: Výsledok SDS-PAGE analýzy izolácie exozómálnej frakcie zo zmrazeného ľudského séra komerčným kitom od firmy Invitrogen po predchádzajúcej deplecii HSA komerčným kitom od firmy Merck. 12% polyakrylamidový gél, 5% zaostrovací gél, vzorkový pufer F; farbenie Commasie brilliant blue; MM (molekulový marker); PV (pôvodná vzorka séra po deplecii HSA); S1 (vyizolovaná exozómálna frakcia z depletovaného séra)

Pri analýze metódou Semi-Dry WB sa prvotne dávkovali vzorky v pomere 5 μ l k 5 μ l vzorkového pufru F na 12% polyakrylamidový gél. Po rozdelení proteínov nasledoval blotting na nitrocelulóзовú membránu. Ako primána protilátka sa použili polyklonálne králičie anti-CD63 IgG (Invitrogen) nariedené v pomere 1:1000 blokovacieho roztoku. Konjugát anti-králičie IgG-HRP (Sigma-Aldrich) boli nariedené v pomere 1:10 000 rovnakého roztoku ako u primárnych protilátok. Po aplikácii enzymatického substrátu sa membrána nechala vyvolať v prístroji ChemiDoc vid' Obrázok 40. Pri výsledku Semi-Dry WB analýzy sa opäť prejavila nešpecifická reakcia konjugátu s proteínmi molekulového markeru. Zároveň sa nám vizualizovali pružky jednak vo frakcii pôvodnej vzorky séra po deplecii HSA ako aj vo vyizolovanej frakcii (S1) čo nás prednostne zaujíma.

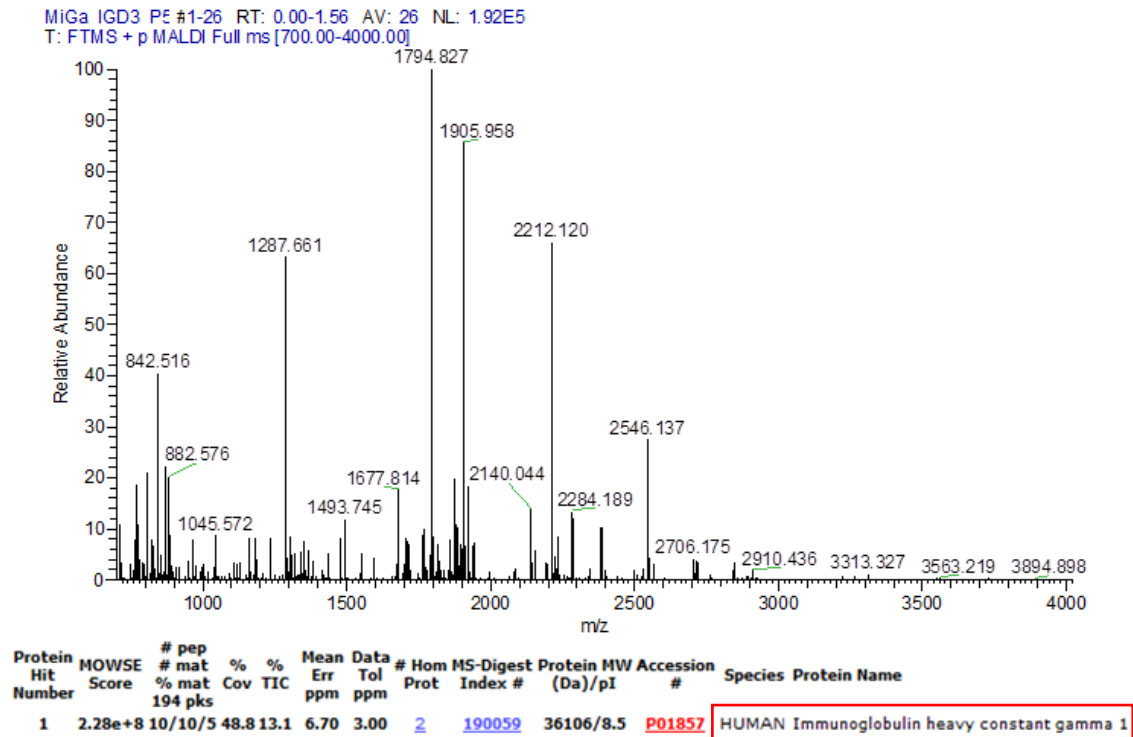


Obrázok 39: Výsledok WB analýzy pre overenie reakcie primárnych polyklonálnych králičích anti-ľudských CD63 IgG s exozomálnymi proteínmi vyizolovanými zo zmrazeného ľudského séra komerčným kitom od firmy Invitrogen po predchádzajúcej deplecii HSA zo séra. 10 % polyakrylamidový gél, 5% zaostrovaný gél, vzorkový pufer F; riedenie primárnej protilátky 1:1000; riedenie konjugátu anti-králičie IgG-HRP 1:10 000; MMd (molekulový marker dual color); PV (pôvodná vzorka séra po deplecii HSA); S1 (vyizolovaná exozomálna frakcia z depletovaného séra)

5.6 Hmotnostná analýza pre overenie prítomnosti exozómov vo vyizolovanej frakcii z ľudského séra metódou proteolytického štiepenia z gélu modifikovaným trypsínom

Na základe výsledku z Western blotu predchádzajúcej analýzy v kapitole 5.3.3 sme si potrebovali overiť prítomnosť exozomálneho proteínu CD63 vo vyizolovanej frakcii (S1). Na overenie sa použila metóda proteolytického štiepenia z gélu ofarbeného Commasie brilliant blue, vyobrazeného na *Obrázku 39*. Postup tejto metódy je bližšie uvedený v kapitole 4.9. Z výsledného ofarbeného gélu sa vyrezal prúžok vyznačený na *Obrázku 39*, ktorý sa podľa postupu rozmelnil v skúmavke a následne sa odfarbil 100 μ l odfarbovacieho roztoku (50% ACN / 50 mM ABC). Gél sa premýval 100% ACN a postupne sa ďalej upravoval. Po konečnej úprave gélu sa k nemu pridalo 50 μ l roztoku modifikovaného trypsínu (10 ng / μ l v 10 mM NH_4HCO_3 s 10% ACN). Po 18 hodinovom naštepení bol odobratý supernatant a okyslený s 5% TFA na výslednú hodnotu pH 3 – 4. K zbytkovému gélu sa pridalo 50 μ l extrakčného roztoku (60% ACN / 2% FA). Extrahované peptidy a supernatant boli vysušené (45 °C) a následne boli rozpustené v 20 μ l 0,1% TFA. Takto upravené vzorky peptidov boli pred hmotnostnou analýzou (Mass spectrometry, MS) skladované pri teplote -20 °C. Analýzou vzoriek s využitím

hmotnostného spektrometru MALDI LTQ Orbitrap XL boli získané MALDI-Orbitrap hmotnostné spektrá vid' *Obrázok 41*. Výsledky analýzy boli vyhodnotené metódou „Peptide Mass Fingerprinting“ v online programe MS-Fit. Experimentálne dáta boli v tomto programe porovnané s teoretickými hodnotami proteínov vo Swiss-Prot databáze.



Obrázok 40: Vyhodnotenie dát získaných hmotnostnou spektrometriou analyzovanej vzorky po naštepení z gélu modifikovaným trypsínom pomocou Swiss-Prot databázy.

Po analyzovaní dát získaných z hmotnostného spektra a porovnaním s proteínmi vo Swiss-Prot databáze došlo k určeni, že sa jedná o ťažké reťazce IgG1(vid' *Obrázok 41*) bežne prítomné v ľudskom sére. Teda sa nám nepotvrdila prítomnosť exozomálneho proteínu CD63 vo vyzolovanej frakcii získanej komerčným kitom od firmy Invitrogen.

6 Zhrnutie výsledkov

Práca pre zavedenie systému na izoláciu exozómov pozostávala z niekoľkých krokov. Prvým bolo príprava imunosorbentu metódou zosieťovania s DMP a karbodiimidovou metódou so zmesou EDC a Sulfo-NHS. Vhodný magnetický nosič sa volil na modelovom systéme s anti-CAI a CAI. Na základe účinnosti väzby Ab overenej SDS-PAGE a metódou Semi-Dry WB sa vybral ako vhodný nosič BcMag Proteín G magnetické častice.

V ďalšom kroku sa izolovali exozómy z ľudského séra komerčnými testami od firiem Exiqon a Invitrogen na báze imunoprecipitácie. Po porovnaní zisku vyizolovanej frakcie SDS-PAGE sa ďalej používal už len izolačný kit od firmy Invitrogen. Prítomnosť exozomálnych proteínov CD63 a CD81 v sére sa overovalo SDS-PAGE s následným blottingom na nitrocelulóзовú membránu s monoklonálnymi myšimi anti-CD63 a 81 IgG. Po nepreukázaní prítomnosti CD63 a 81 sa otestovala funkčnosť protilátok metódou Dot blot. Nepreukázala sa pozitívna reakcia protilátok s CD63 a CD81, preto sa prešlo k použitiu polyklonálnych králičích anti-CD63 IgG. Opäť sa izolovali exozómy a ich prítomnosť sa detegovala s anti-CD63 IgG metódou Semi-Dry WB. Ako konjugát sa používali anti-králičie IgG-HRP. Zistila sa pri nich nešpecifická reakcia s proteínmi molekulového markeru. Polyklonálne anti-CD63 IgG sa použili aj pre prípravu imunosorbentu na izoláciu exozómov. Obdobne ako pri modelovom systéme s CAI sa anti-CD63 IgG imobilizovali na nosič BcMag Proteín G. Takto pripraveným imunosorbentom sa izolovali exozómy z ľudského séra. Prítomnosť CD63 sa overovala so Semi-Dry WB, no ich prítomnosť sa vo väzbovej a elučných frakciách sére nepreukázala.

Pri izolácii komerčným testom ostávali zvyšky HSA, ktoré mohli brániť izolácii. Preto sa postup optimalizoval odstránením HSA zo séra. Z depletovaného séra sa izolovali exozómy a prítomnosť CD63 sa overovala Semi-dry WB. Aj napriek odstráneniu HSA zo séra sa nepreukázala prítomnosť CD63 v sére. Posledným krokom bola hmotnostná analýza po proteolytickom vyštepení proteínov z gélu modifikovaným trypsínom. Po analýze dát získaných z hmotnostného spektra a porovnaním s proteínmi vo Swiss-Prot databáze došlo k určeniu, že sa jedná o ťažké reťazce IgG1 bežne sa vyskytujúce v ľudskom sére.

Napriek rôznym optimalizačným krokom tieto zavedené separačné prístupy neposkytli nástroj pre izoláciu exozómov zo séra. Ku kritickým krokom mohlo dôjsť z dôvodu agregácie exozómov a tým zmenou ich rozmerov, či ich nízkou koncentráciou vo vyšetrovaných vzorkách séra. Taktiež úskalia mohli byť zapríčinené proteolytickým rozpadom exozómov vo vzorkách séra pri ich odbere alebo dlhodobom skladovaní ba dokonca kvalitou samotných

protilátok. Keďže použité komerčné protilátky sa od seba často líšia šaržou aj od jedného výrobcu. Taktiež mohlo dôjsť k zmene ich väzbovej aktivity po väzbe na príslušný antigén a to v konečnom dôsledku viedlo k zníženej výťažnosti.

Úskalia v tomto systéme môžu byť na rôznych úrovňach od prípravy vzoriek sér, ich skladovania až po samotnú izoláciu a následnú detekciu exozómov. Síce sa podarilo realizovať niektoré z krokov, no je nutné v budúcnosti overiť ich správnosť novšími metódami detekcie. Akými sú napríklad mikrofluidné systémy, ktoré by sa mohli zapojiť do optimalizácie tohto systému izolácie exozómov namiesto metódy Semi-Dry WB, ktorej limit detekcie nemusel byť schopný zachytiť prípadnú nízku koncentráciu analyzovaných exozomálnych proteínov. Ďalšou možnosťou je optimalizácia pH a koncentrácie solí používaných roztokov pri jednotlivých krokoch, ktoré mohli ovplyvniť fyziologický stav exozómov.

7 Záver

Cieľom tejto diplomovej práce bolo zavedenie systému pre izoláciu exozómov z ľudskej krvi. Systém bol navrhnutý na spôsob imunoanalýzy v podobe magnetickej separácie a imunoprecipitácie. Účelom práce bolo inovatívne prispieť k problematike izolácie exozómov zjednodušením či nahradením niektorých krokov a tým prípadne znížiť aj samotné náklady. V rámci tejto diplomovej práce sa podarilo zaviesť a správne použiť vybrané metódy, pracovné postupy, ktoré je nutné použiť, ak chceme optimalizovať metódu izolácie exozómov a využiť tak prednosti metódy imunomagnetickej separácie. Práca upozornila na jednotlivé úskalia, ktoré takýto prístup prináša a ukázala cestu, ako postupovať, ak chceme získať protokol pre efektívny a šetrný spôsob izolácie exozómov z ľudskej krvi pre ďalšie štúdie.

8 Použitá literatúra

- [1] RAPOSO, Graça a Willem STOORVOGEL. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *The Journal of Cell Biology* [online]. 2013, **200**(4), 373-383 [cit. 2020-02-07]. DOI: 10.1083/jcb.201211138. ISSN 1540-8140. Dostupné z: <https://rupress.org/jcb/article/200/4/373/37234/Extracellular-vesicles-Exosomes-microvesicles-and>
- [2] SHIMODA, Masayuki a Rama KHOKHA. Metalloproteinases in extracellular vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* [online]. 2017, **1864**(11), 1989-2000 [cit. 2019-09-26]. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2017.05.027. ISSN 01674889. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167488917301520>
- [3] AHMED, Khawaja, Manjunatha MUNEGOWDA, Yufeng XIE a Jim XIANG. Intercellular Trogocytosis Plays an Important Role in Modulation of Immune Responses. *Cellular & Molecular Immunology* [online]. 2008, **5**(4), 261-269 [cit. 2020-02-06]. DOI: 10.1038/cmi.2008.32. ISSN 1672-7681. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/cmi200832>
- [4] MARJON, Kristopher a Jennifer GILLETTE. Measurement of Intercellular Transfer to Signaling Endosomes. *Endosome Signaling Part A* [online]. 1. Elsevier, s. 207-221 [cit. 2020-02-06]. Methods in Enzymology. DOI: 10.1016/B978-0-12-397926-1.00012-3. ISBN 9780123979261. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123979261000123>
- [5] SIMPSON, Richard, Søren JENSEN a Justin LIM. Proteomic profiling of exosomes: Current perspectives. *PROTEOMICS* [online]. 2008, **8**(19), 4083-4099 [cit. 2019-10-16]. DOI: 10.1002/pmic.200800109. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/pmic.200800109>
- [6] BONIFACINO, Juan a Benjamin GLICK. The Mechanisms of Vesicle Budding and Fusion. *Cell* [online]. 2004, **116**(2), 153-166 [cit. 2020-02-06]. DOI: 10.1016/S0092-8674(03)01079-1. ISSN 00928674. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867403010791>
- [7] BHUIN, Tanmay a Jagat ROY. Rab proteins: The key regulators of intracellular vesicle transport. *Experimental Cell Research* [online]. 2014, **328**(1), 1-19 [cit. 2020-02-05]. DOI: 10.1016/j.yexcr.2014.07.027. ISSN 00144827. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014482714003188>
- [8] HAMMER, John a Xufeng WU. Rabs grab motors: defining the connections between Rab GTPases and motor proteins. *Current Opinion in Cell Biology* [online]. 2002, **14**(1), 69-75 [cit. 2020-02-06]. DOI: 10.1016/S0955-0674(01)00296-4. ISSN 09550674. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0955067401002964>
- [9] SHORT, Benjamin, Christian PREISINGER a Julia SCHALETZKY. The Rab6 GTPase Regulates Recruitment of the Dynactin Complex to Golgi Membranes. *Current Biology* [online]. 2002, **12**(20), 1792-1795 [cit. 2020-02-06]. DOI: 10.1016/S0960-9822(02)01221-

6. ISSN 09609822. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982202012216>
- [10] SÖLLNER, Thomas, Sidney WHITEHEART a Michael BRUNNER. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* [online]. 1993, **362**(6418), 318-324 [cit. 2020-02-06]. DOI: 10.1038/362318a0. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/362318a0>
- [11] HARDING, Clifford a Philip STAHL. Transferrin recycling in reticulocytes: pH and iron are important determinants of ligand binding and processing. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 1983, **113**(2), 650-658 [cit. 2020-01-24]. DOI: 10.1016/0006-291X(83)91776-X. ISSN 0006291X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0006291X8391776X>
- [12] BRINTON, Lindsey, Hillary SLOANE, Mark KESTER a Kimberly KELLY. Formation and role of exosomes in cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences* [online]. 2015, **72**(4), 659-671 [cit. 2020-01-24]. DOI: 10.1007/s00018-014-1764-3. ISSN 1420-682X. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00018-014-1764-3>
- [13] J. CRENSHAW, Brennetta, Brian SIMS a Qiana L. MATTHEWS. Biological Function of Exosomes as Diagnostic Markers and Therapeutic Delivery Vehicles in Carcinogenesis and Infectious Diseases. *Nanomedicines* [online]. 2018. IntechOpen, 2019, s. 1-32 [cit. 2020-01-23]. DOI: 10.5772/intechopen.80225. ISBN 978-1-78985-283-7. Dostupné z: <https://www.intechopen.com/books/nanomedicines/biological-function-of-exosomes-as-diagnostic-markers-and-therapeutic-delivery-vehicles-in-carcinoge>
- [14] ARRAUD, N., R. LINARES, S. TAN, C. GOUNOU, J.-M. PASQUET, S. MORNET a A. BRISSON. Extracellular vesicles from blood plasma: determination of their morphology, size, phenotype and concentration. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* [online]. 2014, **12**(5), 614-627 [cit. 2020-01-24]. DOI: 10.1111/jth.12554. ISSN 15387933. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/jth.12554>
- [15] ROBBINS, Paul a Adrian MORELLI. Regulation of immune responses by extracellular vesicles. *Nature Reviews Immunology* [online]. 2014, **14**(3), 195-208 [cit. 2020-02-07]. DOI: 10.1038/nri3622. ISSN 1474-1733. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nri3622>
- [16] SIMONS, Mikael a Graça RAPOSO. Exosomes – vesicular carriers for intercellular communication. *Current Opinion in Cell Biology* [online]. 2009, **21**(4), 575-581 [cit. 2020-01-22]. DOI: 10.1016/j.ceb.2009.03.007. ISSN 09550674. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0955067409000775>
- [17] GURUNATHAN, Sangiliyandi, Min-Hee KANG a Muniyandi JEYARAJ. Review of the Isolation, Characterization, Biological Function, and Multifarious Therapeutic Approaches of Exosomes. *Cells* [online]. 2019, **8**(4), 1-36 [cit. 2020-02-03]. DOI: 10.3390/cells8040307. ISSN 2073-4409. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2073-4409/8/4/307>

- [18] GYÖRGY, Bence, Tamás SZABÓ a Mária PÁSZTÓI. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cellular and Molecular Life Sciences* [online]. 2011, **68**(16), 2667-2688 [cit. 2019-09-26]. DOI: 10.1007/s00018-011-0689-3. ISSN 1420-682X. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00018-011-0689-3>
- [19] CAMPOS-SILVA, Carmen, Henar SUÁREZ a Ricardo JARA-ACEVEDO. High sensitivity detection of extracellular vesicles immune-captured from urine by conventional flow cytometry. *Scientific Reports* [online]. 2019, **9**(1), 1-12 [cit. 2019-09-29]. DOI: 10.1038/s41598-019-38516-8. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/s41598-019-38516-8>
- [20] CONTRERAS-NARANJO, Jose, Hung-Jen WU a Victor UGAZ. Microfluidics for exosome isolation and analysis: enabling liquid biopsy for personalized medicine. *Lab on a Chip* [online]. 2017, **17**(21), 3558-3577 [cit. 2020-03-08]. DOI: 10.1039/C7LC00592J. ISSN 1473-0197. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C7LC00592J>
- [21] CARUSO BAVISOTTO, Celeste, Federica SCALIA a Antonella MARINO GAMMAZZA. Extracellular Vesicle-Mediated Cell-Cell Communication in the Nervous System: Focus on Neurological Diseases. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2019, **20**(2), 1-23 [cit. 2020-02-06]. DOI: 10.3390/ijms20020434. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/20/2/434>
- [22] ZARÀ, Marta, Gianni GUIDETTI a Marina CAMERA. Biology and Role of Extracellular Vesicles (EVs) in the Pathogenesis of Thrombosis. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2019, **20**(11), 1-32 [cit. 2019-11-10]. DOI: 10.3390/ijms20112840. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/11/2840>
- [23] BORGES, F.T., L.A. REIS a N. SCHOR. Extracellular vesicles: structure, function, and potential clinical uses in renal diseases. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* [online]. 2013, **46**(10), 824-830 [cit. 2020-01-22]. DOI: 10.1590/1414-431X20132964. ISSN 0100-879X. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3854311/>
- [24] WOLF, Peter. The Nature and Significance of Platelet Products in Human Plasma. *British Journal of Haematology* [online]. 1967, **13**(3), 269-288 [cit. 2020-02-26]. DOI: 10.1111/j.1365-2141.1967.tb08741.x. ISSN 0007-1048. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2141.1967.tb08741.x>
- [25] MAUSE, Sebastian a Christian WEBER. Microparticles: Protagonists of a Novel Communication Network for Intercellular Information Exchange. *Circulation Research* [online]. 2010, **107**(9), 1047-1057 [cit. 2020-02-26]. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.110.226456. ISSN 0009-7330. Dostupné z: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCRESAHA.110.226456>
- [26] CARUSO, Sarah a Ivan POON. Apoptotic Cell-Derived Extracellular Vesicles: More Than Just Debris. *Frontiers in Immunology* [online]. 2018, **9**(1486), 1-9 [cit. 2020-02-13]. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01486. ISSN 1664-3224. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.01486/full>

- [27] JIANG, Lanzhou, Stephanie PAONE a Sarah CARUSO. Determining the contents and cell origins of apoptotic bodies by flow cytometry. *Scientific Reports* [online]. 2017, **7**(1), 1-12 [cit. 2020-02-13]. DOI: 10.1038/s41598-017-14305-z. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/s41598-017-14305-z>
- [28] XU, Xuebo, Yueyang LAI a Zi-Chun HUA. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. *Bioscience Reports* [online]. 2019, **39**(1), 1-17 [cit. 2020-02-13]. DOI: 10.1042/BSR20180992. ISSN 0144-8463. Dostupné z: <https://portlandpress.com/bioscirep/article/doi/10.1042/BSR20180992/191/Apoptosis-and-apoptotic-body-disease-message-and>
- [29] TIXEIRA, Rochelle, Sarah CARUSO, Stephanie PAONE a kol ATKIN-SMITH. Defining the morphologic features and products of cell disassembly during apoptosis. *Apoptosis* [online]. 2017, **22**(3), 475-477 [cit. 2020-02-13]. DOI: 10.1007/s10495-017-1345-7. ISSN 1360-8185. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10495-017-1345-7>
- [30] MAAS, Sybren, Xandra BREAKFIELD a Alissa WEAVER. Extracellular Vesicles: Unique Intercellular Delivery Vehicles. *Trends in Cell Biology* [online]. 2017, **27**(3), 172-188 [cit. 2019-09-25]. DOI: 10.1016/j.tcb.2016.11.003. ISSN 09628924. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0962892416301799>
- [31] COCUCCI, Emanuele a Jacopo MELDOLESI. Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles. *Trends in Cell Biology* [online]. 2015, **25**(6), 364-372 [cit. 2019-11-10]. DOI: 10.1016/j.tcb.2015.01.004. ISSN 09628924. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096289241500015X>
- [32] KOWAL, Joanna, Guillaume ARRAS a Marina COLOMBO. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2016, **113**(8), 968-977 [cit. 2019-09-29]. DOI: 10.1073/pnas.1521230113. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1521230113>
- [33] ZHANG, Mengdi, Ke JIN a Liang GAO. Methods and Technologies for Exosome Isolation and Characterization. *Small Methods* [online]. 2018, **2**(9), 1-10 [cit. 2020-03-04]. DOI: 10.1002/smt.201800021. ISSN 23669608. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/smt.201800021>
- [34] DÍAZ-VARELA, Míriam, Armando DE MENEZES-NETO a Daniel PEREZ-ZSOLT. Proteomics study of human cord blood reticulocyte-derived exosomes. *Scientific Reports* [online]. 2018, **8**(1), 1-11 [cit. 2019-10-16]. DOI: 10.1038/s41598-018-32386-2. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/s41598-018-32386-2>
- [35] PAN, Bin-Tao a Rose JOHNSTONE. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell* [online]. 1983, **33**(3), 967-978 [cit. 2019-10-16]. DOI: 10.1016/0092-8674(83)90040-5. ISSN 00928674. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0092867483900405?via%3Dihub>

- [36] KOUREMBANAS, Stella. Exosomes: Vehicles of Intercellular Signaling, Biomarkers, and Vectors of Cell Therapy. *Annual Review of Physiology* [online]. 2015, **77**(1), 13-27 [cit. 2019-10-16]. DOI: 10.1146/annurev-physiol-021014-071641. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-physiol-021014-071641>
- [37] VAN NIEL, Guillaume, Isabel PORTO-CARREIRO, Sabrina SIMOES a Graça RAPOSO. Exosomes: A Common Pathway for a Specialized Function. *The Journal of Biochemistry* [online]. 2006, **140**(1), 13-21 [cit. 2019-10-16]. DOI: 10.1093/jb/mvj128. Dostupné z: <http://academic.oup.com/jb/article/140/1/13/2182139/Exosomes-A-Common-Pathway-for-a-Specialized>
- [38] WUBBOLTS, Richard, Rachel LECKIE, Peter VEENHUIZEN a kol SLOT. Proteomic and Biochemical Analyses of Human B Cell-derived Exosomes. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2003, **278**(13), 10963-10972 [cit. 2020-01-22]. DOI: 10.1074/jbc.M207550200. ISSN 0021-9258. Dostupné z: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M207550200>
- [39] ZHANG, Yuan, Yunfeng LIU, Haiying LIU a Wai TANG. Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell & Bioscience* [online]. 2019, **9**(1), 1-18 [cit. 2020-01-17]. DOI: 10.1186/s13578-019-0282-2. ISSN 2045-3701. Dostupné z: <https://cellandbioscience.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13578-019-0282-2>
- [40] CAÑAS, José, Beatriz SASTRE, José RODRIGO-MUÑOZ a Victoria DEL POZO. Exosomes: A new approach to asthma pathology. *Clinica Chimica Acta* [online]. 2019, **495**, 139-147 [cit. 2020-01-26]. DOI: 10.1016/j.cca.2019.04.055. ISSN 00098981. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009898119317966>
- [41] TRAJKOVIC, K., C. HSU, S. CHIANTIA et al. Ceramide Triggers Budding of Exosome Vesicles into Multivesicular Endosomes. *Science* [online]. 2008, **319**(5867), 1244-1247 [cit. 2020-01-24]. DOI: 10.1126/science.1153124. ISSN 0036-8075. Dostupné z: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1153124>
- [42] SCHIFFELERS, Raymond, Sander KOOIJMANS a SM VADER. Exosome mimetics: a novel class of drug delivery systems. *International Journal of Nanomedicine* [online]. 2012, (7), 1525-1541 [cit. 2020-01-17]. DOI: 10.2147/IJN.S29661. ISSN 1178-2013. Dostupné z: <http://www.dovepress.com/exosome-mimetics-a-novel-class-of-drug-delivery-systems-peer-reviewed-article-IJN>
- [43] LIM, Jiyun, Mihye CHOI a HyungJae LEE. Direct isolation and characterization of circulating exosomes from biological samples using magnetic nanowires. *Journal of Nanobiotechnology* [online]. 2019, **17**(1), 1-12 [cit. 2020-01-26]. DOI: 10.1186/s12951-018-0433-3. ISSN 1477-3155. Dostupné z: <https://jnanobiotechnology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12951-018-0433-3>
- [44] WANG, Jianjun, Yongliang YAO, Jianhong WU a Guangxin LI. Identification and analysis of exosomes secreted from macrophages extracted by different methods. *Int J Clin Exp Pathol* [online]. 2015, **8**(6), 6135-6142 [cit. 2020-01-26]. ISSN 1936-2625/IJCEP0008583. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4525825/>

- [45] RECORD, Michel, Kevin CARAYON, Marc POIROT a Sandrine SILVENTE-POIROT. Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell–cell communication and various pathophysiologicals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* [online]. 2014, **1841**(1), 108-120 [cit. 2019-11-10]. DOI: 10.1016/j.bbalip.2013.10.004. ISSN 13881981. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1388198113002199>
- [46] MATHIVANAN, Suresh, Hong JI a Richard SIMPSON. Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication. *Journal of Proteomics* [online]. 2010, **73**(10), 1907-1920 [cit. 2020-02-09]. DOI: 10.1016/j.jprot.2010.06.006. ISSN 18743919. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1874391910001843>
- [47] TAMKOVICH, S., O. TUTANOV a P. LAKTIONOV. Exosomes: Generation, structure, transport, biological activity, and diagnostic application. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology* [online]. 2016, **10**(3), 163-173 [cit. 2020-02-06]. DOI: 10.1134/S1990747816020112. ISSN 1990-7478. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1134/S1990747816020112>
- [48] KAWAMURA, Yumi, Yusuke YAMAMOTO, Taka-Aki SATO a Takahiro OCHIYA. Extracellular vesicles as trans-genomic agents: Emerging roles in disease and evolution. *Cancer Science* [online]. 2017, **108**(5), 824-830 [cit. 2020-03-08]. DOI: 10.1111/cas.13222. ISSN 13479032. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5448650/>
- [49] ELDH, Maria, Karin EKSTRÖM, Hadi VALADI, kol TAILLEUX a LÖTVALL. Exosomes Communicate Protective Messages during Oxidative Stress; Possible Role of Exosomal Shuttle RNA. *PLoS ONE* [online]. 2010, **5**(12), 1-8 [cit. 2020-02-06]. DOI: 10.1371/journal.pone.0015353. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0015353>
- [50] VALADI, Hadi, Karin EKSTRÖM a Apostolos BOSSIOS. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology* [online]. 2007, **9**(6), 654-659 [cit. 2020-01-27]. DOI: 10.1038/ncb1596. ISSN 1465-7392. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/ncb1596>
- [51] XU, Qian, Yuying ZHAO a Xiaoyan ZHOU. Comparison of the extraction and determination of serum exosome and miRNA in serum and the detection of miR-27a-3p in serum exosome of ALS patients. *Intractable & Rare Diseases Research* [online]. 2018, **7**(1), 13-18 [cit. 2020-01-27]. DOI: 10.5582/irdr.2017.01091. ISSN 2186-361X. Dostupné z: https://www.jstage.jst.go.jp/article/irdr/7/1/7_2017.01091/_article
- [52] LÄSSER, Cecilia. Exosomal RNA as biomarkers and the therapeutic potential of exosome vectors. *Expert Opinion on Biological Therapy* [online]. 2012, **12**(1), 189-197 [cit. 2020-01-23]. DOI: 10.1517/14712598.2012.680018. ISSN 1471-2598. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/14712598.2012.680018>
- [53] THAKUR, Basant, Haiying ZHANG, Annette BECKER a kol BROMBERG. Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. *Cell Research* [online].

- 2014, **24**(6), 766-769 [cit. 2020-02-09]. DOI: 10.1038/cr.2014.44. ISSN 1001-0602. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/cr201444>
- [54] TAKAHASHI, Akiko, Ryo OKADA a Koji NAGAO. Exosomes maintain cellular homeostasis by excreting harmful DNA from cells. *Nature Communications* [online]. 2017, **8**(1), 1-14 [cit. 2020-02-09]. DOI: 10.1038/ncomms15287. ISSN 2041-1723. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/ncomms15287>
- [55] OSAKI, Mitsuhiko a Futoshi OKADA. Exosomes and Their Role in Cancer Progression. *Yonago Acta Medica* [online]. 2019, **62**(2), 182-190 [cit. 2020-02-09]. DOI: 10.33160/yam.2019.06.002. ISSN 1346-8049. Dostupné z: https://www.jstage.jst.go.jp/article/yam/62/2/62_2019.06.002/_article
- [56] SU, Sheng-An, Yao XIE a Zurong FU. Emerging role of exosome-mediated intercellular communication in vascular remodeling. *Oncotarget* [online]. 2017, **8**(15), 25700-25712 [cit. 2019-10-10]. DOI: 10.18632/oncotarget.14878. ISSN 1949-2553. Dostupné z: <http://www.oncotarget.com/fulltext/14878>
- [57] POTERYAEV, Dmitry, Sunando DATTA, Karin ACKEMA, Marino ZERIAL a Anne SPANG. Identification of the Switch in Early-to-Late Endosome Transition. *Cell* [online]. 2010, **141**(3), 497-508 [cit. 2020-01-24]. DOI: 10.1016/j.cell.2010.03.011. ISSN 00928674. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867410002473>
- [58] ARYANI, Arian a Bernd DENECKE. Exosomes as a Nanodelivery System: a Key to the Future of Neuromedicine?. *Molecular Neurobiology* [online]. 2016, **53**(2), 818-834 [cit. 2020-01-22]. DOI: 10.1007/s12035-014-9054-5. ISSN 0893-7648. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12035-014-9054-5>
- [59] VAN NIEL, Guillaume, Isabel PORTO-CARREIRO, Sabrina SIMOES a Graça RAPOSO. Exosomes: A Common Pathway for a Specialized Function. *The Journal of Biochemistry* [online]. 2006, **140**(1), 13-21 [cit. 2019-10-21]. DOI: 10.1093/jb/mvj128. ISSN 1756-2651. Dostupné z: <http://academic.oup.com/jb/article/140/1/13/2182139/Exosomes-A-Common-Pathway-for-a-Specialized>
- [60] COLOMBO, Marina, Catarina MOITA a Guillaume VAN NIEL. Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *Journal of Cell Science* [online]. 2013, **126**(24), 5553-5565 [cit. 2020-01-22]. DOI: 10.1242/jcs.128868. ISSN 0021-9533. Dostupné z: <http://jcs.biologists.org/lookup/doi/10.1242/jcs.128868>
- [61] BABST, Markus. MVB vesicle formation: ESCRT-dependent, ESCRT-independent and everything in between. *Current Opinion in Cell Biology* [online]. 2011, **23**(4), 452-457 [cit. 2020-02-08]. DOI: 10.1016/j.ceb.2011.04.008. ISSN 09550674. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0955067411000561>
- [62] SCHMIDT, Oliver a David TEIS. The ESCRT machinery. *Current Biology* [online]. 2012, **22**(4), 116-120 [cit. 2019-12-05]. DOI: 10.1016/j.cub.2012.01.028. ISSN 09609822. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982212000292>

- [63] BAIETTI, Maria, Zhe ZHANG, Eva MORTIER a kol DAVID. Syndecan–syntenin–ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nature Cell Biology* [online]. 2012, **14**(7), 677-685 [cit. 2020-02-08]. DOI: 10.1038/ncb2502. ISSN 1465-7392. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/ncb2502>
- [64] KOJIMA, Katsuhiko, Yuji AMANO a Kazuhisa YOSHINO. ESCRT-0 Protein Hepatocyte Growth Factor-regulated Tyrosine Kinase Substrate (Hrs) Is Targeted to Endosomes Independently of Signal-transducing Adaptor Molecule (STAM) and the Complex Formation with STAM Promotes Its Endosomal Dissociation. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2014, **289**(48), 33296-33310 [cit. 2020-01-22]. DOI: 10.1074/jbc.M114.578245. ISSN 0021-9258. Dostupné z: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M114.578245>
- [65] HURWITZ, Stephanie, Meghan CONLON a Mark RIDER. Nanoparticle analysis sheds budding insights into genetic drivers of extracellular vesicle biogenesis. *Journal of Extracellular Vesicles* [online]. 2016, **5**(1), 1-20 [cit. 2020-02-05]. DOI: 10.3402/jev.v5.31295. ISSN 2001-3078. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3402/jev.v5.31295>
- [66] CHAIROUNGDUAN, Arthit, Danielle SMITH a Pierre POCHARD. Exosome release of β -catenin: a novel mechanism that antagonizes Wnt signaling. *The Journal of Cell Biology* [online]. 2010, **190**(6), 1079-1091 [cit. 2020-02-05]. DOI: 10.1083/jcb.201002049. ISSN 1540-8140. Dostupné z: <https://rupress.org/jcb/article/190/6/1079/36080/Exosome-release-of-beta-catenin-a-novel-mechanism-that>
- [67] NAZARENKO, I., S. RANA, A. BAUMANN a kol PREISSNER. Cell Surface Tetraspanin Tspan8 Contributes to Molecular Pathways of Exosome-Induced Endothelial Cell Activation. *Cancer Research* [online]. 2010, **70**(4), 1668-1678 [cit. 2020-02-05]. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2470. ISSN 0008-5472. Dostupné z: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-09-2470>
- [68] HUTAGALUNG, Alex a Peter NOVICK. Role of Rab GTPases in Membrane Traffic and Cell Physiology. *Physiological Reviews* [online]. 2011, **91**(1), 119-149 [cit. 2020-02-06]. DOI: 10.1152/physrev.00059.2009. ISSN 0031-9333. Dostupné z: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/physrev.00059.2009>
- [69] KENNEDY, Matthew J. a Michael D. EHLERS. Mechanisms and Function of Dendritic Exocytosis. *Neuron* [online]. 2011, **69**(5), 856-875 [cit. 2020-02-09]. DOI: 10.1016/j.neuron.2011.02.032. ISSN 08966273. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627311001541>
- [70] MASHOURI, Ladan, Hassan YOUSEFI a Amir AREF. Exosomes: composition, biogenesis, and mechanisms in cancer metastasis and drug resistance. *Molecular Cancer* [online]. 2019, **18**(1), 1-14 [cit. 2020-02-08]. DOI: 10.1186/s12943-019-0991-5. ISSN 1476-4598. Dostupné z: <https://molecular-cancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12943-019-0991-5>

- [71] RUIVO, Carolina, Bárbara ADEM, Miguel SILVA a Sónia MELO. The Biology of Cancer Exosomes: Insights and New Perspectives. *Cancer Research* [online]. 2017, **77**(23), 6480-6488 [cit. 2020-02-08]. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-17-0994. ISSN 0008-5472. Dostupné z: <http://cancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/0008-5472.CAN-17-0994>
- [72] THEODORAKI, M.-N., T. HOFFMANN a T. WHITESIDE. Separation of plasma-derived exosomes into CD3 () and CD3 (-) fractions allows for association of immune cell and tumour cell markers with disease activity in HNSCC patients. *Clinical and Experimental Immunology* [online]. 2018, **192**(3), 271-283 [cit. 2020-02-08]. DOI: 10.1111/cei.13113. ISSN 00099104. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/cei.13113>
- [73] HANAHAN, Douglas a Robert A. WEINBERG. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* [online]. 2011, **144**(5), 646-674 [cit. 2020-02-09]. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013. ISSN 00928674. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867411001279>
- [74] WHITESIDE, Theresa. Induced regulatory T cells in inhibitory microenvironments created by cancer. *Expert Opinion on Biological Therapy* [online]. 2014, **14**(10), 1411-1425 [cit. 2020-02-09]. DOI: 10.1517/14712598.2014.927432. ISSN 1471-2598. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/14712598.2014.927432>
- [75] LI, Irene a Barzin NABET. Exosomes in the tumor microenvironment as mediators of cancer therapy resistance. *Molecular Cancer* [online]. 2019, **18**(1), 1-10 [cit. 2020-02-08]. DOI: 10.1186/s12943-019-0975-5. ISSN 1476-4598. Dostupné z: <https://molecular-cancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12943-019-0975-5>
- [76] GAJEWSKI, Thomas, Hans SCHREIBER a Yang-Xin FU. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nature Immunology* [online]. 2013, **14**(10), 1014-1022 [cit. 2020-02-08]. DOI: 10.1038/ni.2703. ISSN 1529-2908. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/ni.2703>
- [77] THÉRY, Clotilde, Matias OSTROWSKI a Elodie SEGURA. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nature Reviews Immunology* [online]. 2009, **9**(8), 581-593 [cit. 2020-02-08]. DOI: 10.1038/nri2567. ISSN 1474-1733. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nri2567>
- [78] LANIER, L. NKG2D Receptor and Its Ligands in Host Defense. *Cancer Immunology Research* [online]. 2015, **3**(6), 575-582 [cit. 2020-02-09]. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0098. ISSN 2326-6066. Dostupné z: <http://cancerimmunolres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/2326-6066.CIR-15-0098>
- [79] HUBER, Veronica, Stefano FAIS, Manuela IERO, kol BALLABIO, Filiberto BELLI a Licia RIVOLTINI. Human Colorectal Cancer Cells Induce T-Cell Death Through Release of Proapoptotic Microvesicles: Role in Immune Escape. *Gastroenterology* [online]. 2005, **128**(7), 1796-1804 [cit. 2020-02-09]. DOI: 10.1053/j.gastro.2005.03.045. ISSN 00165085. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508505005688>

- [80] LIU, Cunren, Shaohua YU a Kurt ZINN. Murine Mammary Carcinoma Exosomes Promote Tumor Growth by Suppression of NK Cell Function. *The Journal of Immunology* [online]. 2006, **176**(3), 1375-1385 [cit. 2020-02-09]. DOI: 10.4049/jimmunol.176.3.1375. ISSN 0022-1767. Dostupné z: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.176.3.1375>
- [81] CLAYTON, Aled, J. MITCHELL, Jacquelyn COURT a kol TABI. Human Tumor-Derived Exosomes Down-Modulate NKG2D Expression. *The Journal of Immunology* [online]. 2008, **180**(11), 7249-7258 [cit. 2020-02-09]. DOI: 10.4049/jimmunol.180.11.7249. ISSN 0022-1767. Dostupné z: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.180.11.7249>
- [82] DE VRIJ, Jeroen, S.L. MAAS a Kitty KWAPPENBERG. Glioblastoma-derived extracellular vesicles modify the phenotype of monocytic cells. *International Journal of Cancer* [online]. 2015, **137**(7), 1630-1642 [cit. 2020-02-09]. DOI: 10.1002/ijc.29521. ISSN 00207136. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.29521>
- [83] TOSETTI, Francesca, Roberta VENÈ a Caterina CAMODECA. Specific ADAM10 inhibitors localize in exosome-like vesicles released by Hodgkin lymphoma and stromal cells and prevent sheddase activity carried to bystander cells. *OncoImmunology* [online]. 2018, **7**(5), 1-14 [cit. 2020-02-10]. DOI: 10.1080/2162402X.2017.1421889. ISSN 2162-402X. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/2162402X.2017.1421889>
- [84] MCCREADY, Jessica, Jessica SIMS, Doug CHAN a Daniel JAY. Secretion of extracellular hsp90 α via exosomes increases cancer cell motility: a role for plasminogen activation. *BMC Cancer* [online]. 2010, **10**(1), 1-10 [cit. 2020-02-09]. DOI: 10.1186/1471-2407-10-294. ISSN 1471-2407. Dostupné z: <http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-10-294>
- [85] SMOLARZ, Mateusz, Monika PIETROWSKA a Natalia MATYSIAK. Proteome Profiling of Exosomes Purified from a Small Amount of Human Serum: The Problem of Co-Purified Serum Components. *Proteomes* [online]. 2019, **7**(2), 1-12 [cit. 2020-01-26]. DOI: 10.3390/proteomes7020018. ISSN 2227-7382. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2227-7382/7/2/18>
- [86] PUHKA, Maija, Maarit TAKATALO a Maria-Elisa NORDBERG. Metabolomic Profiling of Extracellular Vesicles and Alternative Normalization Methods Reveal Enriched Metabolites and Strategies to Study Prostate Cancer-Related Changes. *Theranostics* [online]. 2017, **7**(16), 3824-3841 [cit. 2020-02-08]. DOI: 10.7150/thno.19890. ISSN 1838-7640. Dostupné z: <http://www.thno.org/v07p3824.htm>
- [87] ZAROVNI, Natasa, Antonietta CORRADO, Paolo GUAZZI a kol FONDELLI. Integrated isolation and quantitative analysis of exosome shuttled proteins and nucleic acids using immunocapture approaches. *Methods* [online]. 2015, **87**(1), 46-58 [cit. 2020-03-04]. DOI: 10.1016/j.ymeth.2015.05.028. ISSN 10462023. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1046202315002340>

- [88] ALVAREZ, M., Mahdieh KHOSROHEIDARI, Rupesh KANCHI RAVI a Johanna DISTEFANO. Comparison of protein, microRNA, and mRNA yields using different methods of urinary exosome isolation for the discovery of kidney disease biomarkers. *Kidney International* [online]. 2012, **82**(9), 1024-1032 [cit. 2020-03-19]. DOI: 10.1038/ki.2012.256. ISSN 00852538. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0085253815556755>
- [89] NAKAI, Wataru, Takeshi YOSHIDA a Diego DIEZ. A novel affinity-based method for the isolation of highly purified extracellular vesicles. *Scientific Reports* [online]. 2016, **6**(1), 1-11 [cit. 2020-02-10]. DOI: 10.1038/srep33935. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/srep33935>
- [90] CARADEC, Josselin, Geetanjali KHARMATE a Elham HOSSEINI-BEHESHTI. Reproducibility and efficiency of serum-derived exosome extraction methods. *Clinical Biochemistry* [online]. 2014, **47**(13-14), 1286-1292 [cit. 2020-03-19]. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2014.06.011. ISSN 00099120. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009912014004056>
- [91] MOMEN-HERAVI, Fatemeh, Leonora BALAJ a Sara ALIAN. Impact of Biofluid Viscosity on Size and Sedimentation Efficiency of the Isolated Microvesicles. *Frontiers in Physiology* [online]. 2012, **3**(1), 1-6 [cit. 2020-03-07]. DOI: 10.3389/fphys.2012.00162. ISSN 1664-042X. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2012.00162/abstract>
- [92] PÉREZ-GONZÁLEZ, Rocío, Sebastien GAUTHIER a Asok KUMAR. A Method for Isolation of Extracellular Vesicles and Characterization of Exosomes from Brain Extracellular Space. *Exosomes and Microvesicles* [online]. New York, NY: Springer New York, 2017, **6**(1), 139-151 [cit. 2020-03-19]. DOI: 10.1007/978-1-4939-6728-5_10. ISSN 2045-2322. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-6728-5_10
- [93] WEBBER, Jason a Aled CLAYTON. How pure are your vesicles?. *Journal of Extracellular Vesicles* [online]. 2013, **2**(1), 1-7 [cit. 2020-03-19]. DOI: 10.3402/jev.v2i0.19861. ISSN 2001-3078. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3402/jev.v2i0.19861>
- [94] YU, Li-Li, Jing ZHU a Jin-Xia LIU. A Comparison of Traditional and Novel Methods for the Separation of Exosomes from Human Samples. *BioMed Research International* [online]. 2018, (1), 1-9 [cit. 2020-02-10]. DOI: 10.1155/2018/3634563. ISSN 2314-6133. Dostupné z: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2018/3634563/>
- [95] BÖING, Anita, Edwin VAN DER POL a Anita GROOTEMAAT. Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography. *Journal of Extracellular Vesicles* [online]. 2014, **3**(1), 1-11 [cit. 2020-02-01]. DOI: 10.3402/jev.v3.23430. ISSN 2001-3078. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3402/jev.v3.23430>
- [96] BARANYAI, Tamás, Kata HERCZEG a Zsófia ONÓDI. Isolation of Exosomes from Blood Plasma: Qualitative and Quantitative Comparison of Ultracentrifugation and Size Exclusion Chromatography Methods. *PLOS ONE* [online]. 2015, **10**(12), 1-13 [cit. 2020-01-29]. DOI:

10.1371/journal.pone.0145686. ISSN 1932-6203. Dostupné z:
<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0145686>

- [97] MULLER, Laurent, Chang-Sook HONG a Donna STOLZ. Isolation of biologically-active exosomes from human plasma. *Journal of Immunological Methods* [online]. 2014, **411**(1), 55-65 [cit. 2020-03-19]. DOI: 10.1016/j.jim.2014.06.007. ISSN 00221759. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022175914001902>
- [98] LOBB, Richard, Melanie BECKER a Shu WEN WEN. Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma. *Journal of Extracellular Vesicles* [online]. 2015, **4**(1), 1-11 [cit. 2020-03-21]. DOI: 10.3402/jev.v4.27031. ISSN 2001-3078. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3402/jev.v4.27031>
- [99] THÉRY, Clotilde, Sebastian AMIGORENA, Graça RAPOSO a Aled CLAYTON. Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids. *Current Protocols in Cell Biology* [online]. 2006, **30**(1), s. 1-29 [cit. 2020-03-19]. DOI: 10.1002/0471143030.cb0322s30. ISSN 19342500. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/0471143030.cb0322s30>
- [100] WITWER, Kenneth, Edit BUZÁS a Lynne BEMIS. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *Journal of Extracellular Vesicles* [online]. 2013, **2**(1), 1-26 [cit. 2020-03-19]. DOI: 10.3402/jev.v2i0.20360. ISSN 2001-3078. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3402/jev.v2i0.20360>
- [101] CHERUVANKY, Anita, Hua ZHOU a Trairak PISITKUN. Rapid isolation of urinary exosomal biomarkers using a nanomembrane ultrafiltration concentrator. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* [online]. 2007, **292**(5), 1657-1661 [cit. 2020-03-19]. DOI: 10.1152/ajprenal.00434.2006. ISSN 1931-857X. Dostupné z: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajprenal.00434.2006>
- [102] LAI, Ruenn, Fatih ARSLAN a May LEE. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Research* [online]. 2010, **4**(3), 214-222 [cit. 2020-03-19]. DOI: 10.1016/j.scr.2009.12.003. ISSN 18735061. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S187350610900141X>
- [103] PETERSON, Maureen, Nicole OTOC a Jasmine SETHI. Integrated systems for exosome investigation. *Methods* [online]. 2015, **87**(1), 31-45 [cit. 2020-03-19]. DOI: 10.1016/j.ymeth.2015.04.015. ISSN 10462023. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1046202315001619>
- [104] LIU, Fei, Ophir VERMESH a Vigneshwaran MANI. The Exosome Total Isolation Chip. *ACS Nano* [online]. 2017, **11**(11), 10712-10723 [cit. 2020-03-19]. DOI: 10.1021/acsnano.7b04878. ISSN 1936-0851. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsnano.7b04878>
- [105] ABRAMOWICZ, Agata, Piotr WIDLAK a Monika PIETROWSKA. Proteomic analysis of exosomal cargo: the challenge of high purity vesicle isolation. *Molecular BioSystems*

- [online]. 2016, **12**(5), 1407-1419 [cit. 2020-03-21]. DOI: 10.1039/C6MB00082G. ISSN 1742-206X. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C6MB00082G>
- [106] DOYLE, Laura a Michael WANG. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells* [online]. 2019, **8**(7), 1-24 [cit. 2020-02-10]. DOI: 10.3390/cells8070727. ISSN 2073-4409. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2073-4409/8/7/727>
- [107] HONG, Chang-Sook, Sonja FUNK a Laurent MULLER. Isolation of biologically active and morphologically intact exosomes from plasma of patients with cancer. *Journal of Extracellular Vesicles* [online]. 2016, **5**(1), 1-12 [cit. 2020-03-21]. DOI: 10.3402/jev.v5.29289. ISSN 2001-3078. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3402/jev.v5.29289>
- [108] BENEDIKTER, Birke, Freek BOUWMAN a Tanja VAJEN. Ultrafiltration combined with size exclusion chromatography efficiently isolates extracellular vesicles from cell culture media for compositional and functional studies. *Scientific Reports* [online]. 2017, **7**(1), 1-13 [cit. 2020-03-21]. DOI: 10.1038/s41598-017-15717-7. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/s41598-017-15717-7>
- [109] GÁMEZ-VALERO, Ana, Marta MONGUIÓ-TORTAJADA a Laura CARRERAS-PLANELLA. Size-Exclusion Chromatography-based isolation minimally alters Extracellular Vesicles' characteristics compared to precipitating agents. *Scientific Reports* [online]. 2016, **6**(1), 1-9 [cit. 2020-03-21]. DOI: 10.1038/srep33641. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/srep33641>
- [110] GUERREIRO, Eduarda, Beate VESTAD a Lilly STEFFENSEN. Efficient extracellular vesicle isolation by combining cell media modifications, ultrafiltration, and size-exclusion chromatography. *PLOS ONE* [online]. 2018, **13**(9), 1-17 [cit. 2020-03-21]. DOI: 10.1371/journal.pone.0204276. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0204276>
- [111] DE MENEZES-NETO, Armando, María SÁEZ a Inés LOZANO-RAMOS. Size-exclusion chromatography as a stand-alone methodology identifies novel markers in mass spectrometry analyses of plasma-derived vesicles from healthy individuals. *Journal of Extracellular Vesicles* [online]. 2015, **4**(1), 1-14 [cit. 2020-03-21]. DOI: 10.3402/jev.v4.27378. ISSN 2001-3078. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3402/jev.v4.27378>
- [112] ZERINGER, Emily, Timothy BARTA, Mu LI a Alexander VLASSOV. Strategies for Isolation of Exosomes. *Cold Spring Harbor Protocols* [online]. 2015, **2015**(4), 1-6 [cit. 2020-03-19]. DOI: 10.1101/pdb.top074476. ISSN 1940-3402. Dostupné z: <http://www.cshprotocols.org/lookup/doi/10.1101/pdb.top074476>
- [113] ZERINGER, Emily, Mu LI a Tim BARTA. Methods for the extraction and RNA profiling of exosomes. *World Journal of Methodology* [online]. 2013, **3**(1), 11-18 [cit. 2020-02-06]. DOI: 10.5662/wjm.v3.i1.11. ISSN 2222-0682. Dostupné z: <http://www.wjgnet.com/2222-0682/full/v3/i1/11.htm>

- [114] PRABHU, R. a K.A. BALASUBRAMANIAN. A Novel Method of Preparation of Small Intestinal Brush Border Membrane Vesicles by Polyethylene Glycol Precipitation. *Analytical Biochemistry* [online]. 2001, **289**(2), 157-161 [cit. 2020-03-18]. DOI: 10.1006/abio.2000.4908. ISSN 00032697. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000326970094908X>
- [115] RIDER, Mark, Stephanie HURWITZ a David MECKES. ExtraPEG: A Polyethylene Glycol-Based Method for Enrichment of Extracellular Vesicles. *Scientific Reports* [online]. 2016, **6**(1), 1-14 [cit. 2020-03-18]. DOI: 10.1038/srep23978. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/srep23978>
- [116] WENG, Yejing, Zhigang SUI a Yichu SHAN. Effective isolation of exosomes with polyethylene glycol from cell culture supernatant for in-depth proteome profiling. *The Analyst* [online]. 2016, **141**(15), 4640-4646 [cit. 2020-03-18]. DOI: 10.1039/C6AN00892E. ISSN 0003-2654. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C6AN00892E>
- [117] CHEN, Bo-Yie, Cheyenne SUNG a Chihchen CHEN. Advances in exosomes technology. *Clinica Chimica Acta* [online]. 2019, **493**, 14-19 [cit. 2020-03-07]. DOI: 10.1016/j.cca.2019.02.021. ISSN 00098981. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000989811930083X>
- [118] ANDREU, Zoraida, Eva RIVAS a Aitana SANGUINO-PASCUAL. Comparative analysis of EV isolation procedures for miRNAs detection in serum samples. *Journal of Extracellular Vesicles* [online]. 2016, **5**(1), 1-10 [cit. 2020-03-19]. DOI: 10.3402/jev.v5.31655. ISSN 2001-3078. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3402/jev.v5.31655>
- [119] TAURO, Bow, David GREENING, Rommel MATHIAS a kol MATHIVANAN. Comparison of ultracentrifugation, density gradient separation, and immunoaffinity capture methods for isolating human colon cancer cell line LIM1863-derived exosomes. *Methods* [online]. 2012, **56**(2), 293-304 [cit. 2020-02-26]. DOI: 10.1016/j.ymeth.2012.01.002. ISSN 10462023. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1046202312000187>
- [120] GALKIN, O., O. BESARAB, M. PYSMENNA, Y. GORSHUNOV a O. DUGAN. Modern magnetic immunoassay: Biophysical and biochemical aspects. *Regulatory Mechanisms in Biosystems* [online]. 2018, **9**(1), 47-55 [cit. 2020-04-14]. DOI: 10.15421/021806. ISSN 2520-2588. Dostupné z: <https://medicine.dp.ua/index.php/med/article/view/403>
- [121] MIZUTANI, KOSUKE, RIYAKO TERAZAWA a KOJI KAMEYAMA. Isolation of Prostate Cancer-related Exosomes. *The International Institute of Anticancer Research* [online]. 2014, **34**(7), 3419-3423 [cit. 2020-03-07]. Dostupné z: <http://ar.iijournals.org/content/34/7/3419.long>
- [122] LI, Pin, Melisa KASLAN a Sze LEE. Progress in Exosome Isolation Techniques. *Theranostics* [online]. 2017, **7**(3), 789-804 [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.7150/thno.18133. ISSN 1838-7640. Dostupné z: <http://www.thno.org/v07p0789.htm>
- [123] WOO, JungReem, Shivani SHARMA a James GIMZEWSKI. The Role of Isolation Methods on a Nanoscale Surface Structure and its Effect on the Size of Exosomes. *Journal*

- of Circulating Biomarkers* [online]. 2016, **5** [cit. 2020-02-01]. DOI: 10.5772/64148. ISSN 1849-4544. Dostupné z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.5772/64148>
- [124] TANG, C.Y. a Z. YANG. Transmission Electron Microscopy (TEM). *Membrane Characterization* [online]. Elsevier, 2017, , 145-159 [cit. 2020-02-20]. DOI: 10.1016/B978-0-444-63776-5.00008-5. ISBN 9780444637765. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444637765000085>
- [125] PAN, Bin-Tao, Kathy TENG a Choan WU. Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *The Journal of Cell Biology* [online]. 1985, **101**(3), 942-948 [cit. 2020-03-15]. DOI: 10.1083/jcb.101.3.942. ISSN 0021-9525. Dostupné z: <https://rupress.org/jcb/article/101/3/942/28305/Electron-microscopic-evidence-for-externalization>
- [126] VAN DER POL, E., A. HOEKSTRA a A. STURK. Optical and non-optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* [online]. 2010, **8**(12), 2596-2607 [cit. 2020-03-09]. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2010.04074.x. ISSN 15387933. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1538-7836.2010.04074.x>
- [127] PISITKUN, T., R.-F. SHEN a M. KNEPPER. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2004, **101**(36), 13368-13373 [cit. 2020-03-09]. DOI: 10.1073/pnas.0403453101. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0403453101>
- [128] COLOMBO, Marina, Graça RAPOSO a Clotilde THÉRY. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* [online]. 2014, **30**(1), 255-289 [cit. 2020-03-16]. DOI: 10.1146/annurev-cellbio-101512-122326. ISSN 1081-0706. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-cellbio-101512-122326>
- [129] LÄSSER, Cecilia, Su JANG a Jan LÖTVALL. Subpopulations of extracellular vesicles and their therapeutic potential. *Molecular Aspects of Medicine* [online]. 2018, **60**, 1-14 [cit. 2020-02-26]. DOI: 10.1016/j.mam.2018.02.002. ISSN 00982997. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0098299717300997>
- [130] GOULD, Stephen a Graça RAPOSO. As we wait: coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles* [online]. 2013, **2**(1), 1-3 [cit. 2020-03-07]. DOI: 10.3402/jev.v2i0.20389. ISSN 2001-3078. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3402/jev.v2i0.20389>
- [131] SHARMA, Shivani, Haider RASOOL, Viswanathan PALANISAMY a kol WONG. Structural-Mechanical Characterization of Nanoparticle Exosomes in Human Saliva, Using Correlative AFM, FESEM, and Force Spectroscopy. *ACS Nano* [online]. 2010, **4**(4), 1921-1926 [cit. 2020-03-07]. DOI: 10.1021/nn901824n. ISSN 1936-0851. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/nn901824n>

- [132] WU, Yueting, Wentao DENG a David KLINKE II. Exosomes: improved methods to characterize their morphology, RNA content, and surface protein biomarkers. *The Analyst* [online]. 2015, **140**(19), 6631-6642 [cit. 2020-02-19]. DOI: 10.1039/C5AN00688K. ISSN 0003-2654. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C5AN00688K>
- [133] HOO, Christopher, Natasha STAROSTIN, Paul WEST a Martha MECARTNEY. A comparison of atomic force microscopy (AFM) and dynamic light scattering (DLS) methods to characterize nanoparticle size distributions. *Journal of Nanoparticle Research* [online]. 2008, **10**(1), 89-96 [cit. 2020-03-09]. DOI: 10.1007/s11051-008-9435-7. ISSN 1388-0764. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11051-008-9435-7>
- [134] SIEDLECKI, Christopher, I. WEN WANG a Julie HIGASHI. Platelet-derived microparticles on synthetic surfaces observed by atomic force microscopy and fluorescence microscopy. *Biomaterials* [online]. 1999, **20**(16), 1521-1529 [cit. 2020-03-09]. DOI: 10.1016/S0142-9612(99)00065-4. ISSN 01429612. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961299000654>
- [135] YUANA, Y., T. OOSTERKAMP, S. BAHATYROVA a kol OSANTO. Atomic force microscopy: a novel approach to the detection of nanosized blood microparticles. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* [online]. 2010, **8**(2), 315-323 [cit. 2020-03-09]. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2009.03654.x. ISSN 15387933. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1538-7836.2009.03654.x>
- [136] SZATANEK, Rafal, Monika BAJ-KRZYWORZEKA, Jakub ZIMOCH a kol SIEDLAR. The Methods of Choice for Extracellular Vesicles (EVs) Characterization. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2017, **18**(6), 1-18 [cit. 2020-03-16]. DOI: 10.3390/ijms18061153. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/18/6/1153>
- [137] BOOTZ, Alexander, Vitali VOGEL, Dieter SCHUBERT a Jörg KREUTER. Comparison of scanning electron microscopy, dynamic light scattering and analytical ultracentrifugation for the sizing of poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. 2004, **57**(2), 369-375 [cit. 2020-03-07]. DOI: 10.1016/S0939-6411(03)00193-0. ISSN 09396411. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0939641103001930>
- [138] FILIPE, Vasco, Andrea HAWE a Wim JISKOOT. Critical Evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the Measurement of Nanoparticles and Protein Aggregates. *Pharmaceutical Research* [online]. 2010, **27**(5), 796-810 [cit. 2020-03-07]. DOI: 10.1007/s11095-010-0073-2. ISSN 0724-8741. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11095-010-0073-2>
- [139] ROBERT, S., P. PONCELET a R. LACROIX. Standardization of platelet-derived microparticle counting using calibrated beads and a Cytomics FC500 routine flow cytometer: a first step towards multicenter studies?. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* [online]. 2009, **7**(1), 190-197 [cit. 2020-03-09]. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2008.03200.x. ISSN 15387933. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1538-7836.2008.03200.x>

- [140] PEDERSEN, K. a B. KIERULF. Direct Isolation of Exosomes from Cell Culture: Simplifying Methods for Exosome Enrichment and Analysis. *Translational Biomedicine* [online]. 2015, **6**(2), 1-9 [cit. 2020-03-22]. DOI: 10.21767/2172-0479.100018. ISSN 21720479. Dostupné z: <http://www.transbiomedicine.com/translational-biomedicine/direct-isolation-of-exosomes-from-cell-culture-simplifying-methods-for-exosome-enrichment-and-analysis.php?aid=6760>
- [141] CHANDLER, W., W. YEUNG a J. TAIT. A new microparticle size calibration standard for use in measuring smaller microparticles using a new flow cytometer. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* [online]. 2011, **9**(6), 1216-1224 [cit. 2020-03-09]. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2011.04283.x. ISSN 15387933. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1538-7836.2011.04283.x>
- [142] KONOKHOVA, Anastasiya, Maxim YURKIN a Alexander MOSKALENSKY. Light-scattering flow cytometry for identification and characterization of blood microparticles. *Journal of Biomedical Optics* [online]. 2012, **17**(5), 1-9 [cit. 2020-03-08]. DOI: 10.1117/1.JBO.17.5.057006. ISSN 10833668. Dostupné z: <http://biomedicaloptics.spiedigitallibrary.org/article.aspx?doi=10.1117/1.JBO.17.5.057006>
- [143] POSPICHALOVA, Vendula, Jan SVOBODA a Zankruti DAVE. Simplified protocol for flow cytometry analysis of fluorescently labeled exosomes and microvesicles using dedicated flow cytometer. *Journal of Extracellular Vesicles* [online]. 2015, **4**(1), 1-16 [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.3402/jev.v4.25530. ISSN 2001-3078. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3402/jev.v4.25530>
- [144] SOKOLOVA, Viktoriya, Anna-Kristin LUDWIG a Sandra HORNUNG. Characterisation of exosomes derived from human cells by nanoparticle tracking analysis and scanning electron microscopy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2011, **87**(1), 146-150 [cit. 2020-03-07]. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2011.05.013. ISSN 09277765. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776511002724>
- [145] DRAGOVIC, Rebecca, Christopher GARDINER, Alexandra BROOKS a kol SARGENT. Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* [online]. 2011, **7**(6), 780-788 [cit. 2020-03-07]. DOI: 10.1016/j.nano.2011.04.003. ISSN 15499634. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1549963411001638>
- [146] GARDINER, Chris, Yannick FERREIRA a Rebecca DRAGOVIC. Extracellular vesicle sizing and enumeration by nanoparticle tracking analysis. *Journal of Extracellular Vesicles* [online]. 2013, **2**(1), 1-11 [cit. 2020-03-16]. DOI: 10.3402/jev.v2i0.19671. ISSN 2001-3078. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3402/jev.v2i0.19671>
- [147] SOO, Chin, Yaqiong SONG a Ying ZHENG. Nanoparticle tracking analysis monitors microvesicle and exosome secretion from immune cells. *Immunology* [online]. 2012, **136**(2), 192-197 [cit. 2020-03-16]. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2012.03569.x. ISSN 00192805. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2567.2012.03569.x>

- [148] NI, Duoqiao, Peng XU a Sean GALLAGHER. Immunoblotting and Immunodetection. *Current Protocols in Molecular Biology* [online]. 2016, **114**(1), 1-37 [cit. 2020-03-21]. DOI: 10.1002/0471142727.mb1008s114. ISSN 1934-3639. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/0471142727.mb1008s114>
- [149] VOJTECH, Lucia, Sangsoon WOO a Sean HUGHES. Exosomes in human semen carry a distinctive repertoire of small non-coding RNAs with potential regulatory functions. *Nucleic Acids Research* [online]. 2014, **42**(11), 7290-7304 [cit. 2020-03-21]. DOI: 10.1093/nar/gku347. ISSN 0305-1048. Dostupné z: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gku347>
- [150] CHO, Siwoo, Wonju JO a Youhee HEO. Isolation of extracellular vesicle from blood plasma using electrophoretic migration through porous membrane. *Sensors and Actuators B: Chemical* [online]. 2016, **233**(1), 289-297 [cit. 2020-03-07]. DOI: 10.1016/j.snb.2016.04.091. ISSN 09254005. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925400516305731>
- [151] KANWAR, Shailender, Christopher DUNLAY, Diane SIMEONE a Sunitha NAGRATH. Microfluidic device (ExoChip) for on-chip isolation, quantification and characterization of circulating exosomes. *Lab Chip* [online]. 2014, **14**(11), 1891-1900 [cit. 2020-03-07]. DOI: 10.1039/C4LC00136B. ISSN 1473-0197. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C4LC00136B>
- [152] SHAO, Huilin, Jaehoon CHUNG a Kyunghoon LEE. Chip-based analysis of exosomal mRNA mediating drug resistance in glioblastoma. *Nature Communications* [online]. 2015, **6**(1), 1-9 [cit. 2020-03-26]. DOI: 10.1038/ncomms7999. ISSN 2041-1723. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/ncomms7999>
- [153] CHEN, Chihchen, Johan SKOG a Chia-Hsien HSU. Microfluidic isolation and transcriptome analysis of serum microvesicles. *Lab Chip* [online]. 2010, **10**(4), 505-511 [cit. 2020-03-07]. DOI: 10.1039/B916199F. ISSN 1473-0197. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=B916199F>
- [154] ASHCROFT, B., J. DE SONNEVILLE a Y. YUANA. Determination of the size distribution of blood microparticles directly in plasma using atomic force microscopy and microfluidics. *Biomedical Microdevices* [online]. 2012, **14**(4), 641-649 [cit. 2020-03-26]. DOI: 10.1007/s10544-012-9642-y. ISSN 1387-2176. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10544-012-9642-y>
- [155] GUO, Shang-Chun, Shi-Cong TAO a Helen DAWN. Microfluidics-based on-a-chip systems for isolating and analysing extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles* [online]. 2018, **7**(1), 1-15 [cit. 2020-03-09]. DOI: 10.1080/20013078.2018.1508271. ISSN 2001-3078. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/20013078.2018.1508271>
- [156] KABOORD, Barbara a Maria PERR. Isolation of Proteins and Protein Complexes by Immunoprecipitation. *2D PAGE: Sample Preparation and Fractionation* [online]. Totowa, NJ: Humana Press, 2008, **424**, 349-364 [cit. 2020-05-07]. Methods in Molecular Biology™.

DOI: 10.1007/978-1-60327-064-9_27. ISBN 978-1-58829-722-8. Dostupné z:
http://link.springer.com/10.1007/978-1-60327-064-9_27